

جامعة محمد الصديق بن يحيى  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
المكتبة  
رقم الجرد : A.808

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel



جامعة جيجل

Faculté des Sciences Exactes et Science  
De la nature et de La vie

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie Moléculaire et  
Cellulaire

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire De Fin D'études Pour L'obtention Du  
Diplôme  
Des Etudes Supérieures en Biologie  
Option : Biochimie  
Intitulé

Etude des paramètres hématologiques dans le cas  
des hémoglobinopathies

Membre de Jury :

Examineur : M<sup>r</sup> LAIB Essaid  
Encadreur : M<sup>me</sup> BENSEGHIER Salima



Présenté par :  
GHASMOUNE Aida  
LABIDI Sihem

Année Universitaire : 2011-2012



## REMERCIEMENT

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et  
miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience  
d'accomplir ce Modeste travail.*

*En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur M<sup>me</sup> :  
BENSEGHIER Salima, pour ses précieux conseils et son aide  
durant toute la période du travail.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury  
pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant  
d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs  
propositions.*

*A ma famille merci pour votre apport permanent tout au long  
de ce parcours.*

*A mes amis pour les multiples encouragements.*

*Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes  
qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce  
travail.*

# *Sommaire*

# Sommaire

Introduction.....	01
-------------------	----

## Chapitre I : Rappel sur l'hémoglobine

I-1 - La structure de l'hémoglobine.....	02
I-1-1- La structure de la globine.....	02
I-1-2-La structure de l'hème.....	04
I-2-Les formes de l'hémoglobine.....	04
I-2-1- L'hémoglobine normale.....	04
I-2-2-L'hémoglobine anormales.....	05
I-3-La biosynthèse de l'hémoglobine.....	06
I-3-1-La biosynthèse de la globine.....	06
I-3-2- La biosynthèse de l'hème.....	06
I-4- Les groupes de gènes qui codent pour l'hémoglobine.....	07
I-4-1- Le groupe de gènes de type $\alpha$ .....	07
I-4-2- Le groupe de gènes de types $\beta$ .....	07
I-5- La fonction de l'hémoglobine.....	08
I-5-1- Le transport de l'oxygène.....	08
I-5-1- Le transport du dioxyde de carbone.....	10
I-6- Le catabolisme.....	10

## Chapitre II : Les hémoglobinopathies

II-1-les Types d'hémoglobine anormale.....	12
II-2-Les différents types de mutation.....	12
II-3-Les classes de l'hémoglobinopathie.....	14
II-3-1- Les anomalies structurales.....	14
II-3-1-1- La drépanocytose.....	15
II-3-1-2- L'hémoglobine E.....	17
II-3-1-3- L'hémoglobine C.....	18
II-3-1-4- L'hémoglobine instable.....	18
II-3-1-5- L'hémoglobine M.....	19
II-3-1-6- L'hémoglobine à affinité modifiée pour l'oxygène.....	19
II-3-1-7- L'hémoglobinosose S / $\beta$ thalassémies.....	20
II-3-2-Les thalassémies.....	20
II-3-2-1- La Génétique des thalassémies.....	20
II-3-2-2- Les différents types de thalassémie.....	20
II-3-2-2-1- Les $\beta$ - thalassémies.....	20
II-3-2-2-2- Les $\alpha$ -thalassémies.....	23

## Chapitre III : Le diagnostic biologique des hémoglobinopathies

III-1- Le diagnostic biologique classique.....	27
III-1-1- L'hémogramme.....	27
III-1-2- Les techniques électrophorétiques et chromatographiques.....	27

III-1-2-1- L'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin.....	27
III-1-2-2- L'électrophorèse sur agar à pH acide.....	28
III-1-2-3- L'isoélectrofocalisation.....	28
III-1-2-4- L'électrophorèse des chaînes de globine.....	29
III-1-2-5- La chromatographie échangeuse d'ions.....	29
III-1-2-6- La chromatographie liquide sur colonne échangeuse de cations.....	29
III-1-2-7- La chromatographie liquide haute performance en phase inverse.....	29
III-1-3- Les techniques hématologiques et biochimiques complémentaires.....	30
III-1-3-1- Le test de falciformation.....	30
III-1-3-2- Le test de KLEIHAUER.....	30
III-1-3-3- Les tests permettant le dosage de l'hémoglobine F.....	30
III-1-3-4- Le test de la stabilité de l'hémoglobine.....	31
III-1-3-5- Le test de stabilité de l'HbA.....	31
III-1-3-6- La recherche de corps de Heinz.....	31
III-1-3-7- Les cristaux d'hémoglobine C.....	31
III-1-3-8- Les corps de pappenheimer.....	31
III-1-3-9- La courbe de dissociation de l'hémoglobine.....	32
III-2- Le diagnostic par la biologie moléculaire.....	32
<b>Conclusion.....</b>	<b>34</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>35</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Glossaire</b>	



## Liste des figures

<b>Figure n°01</b>	Structure tridimensionnelle de l'hémoglobine $\alpha_2\beta_2$ .....	03
<b>Figure n°02</b>	Molécule d'hémoglobine.....	03
<b>Figure n°03</b>	Les sous-unités des globines.....	03
<b>Figure n°04</b>	Structure de l'hème.....	04
<b>Figure n°05</b>	Les gènes de la globine.....	05
<b>Figure n°06</b>	Coordination de la synthèse des sous-unités de globine.....	06
<b>Figure n°07</b>	Organisation des gènes globines .....	07
<b>Figure n°08</b>	Courbe de saturation de l'Hb en oxygène.....	09
<b>Figure n°09</b>	Modification de la conformation de l'hémoglobine après oxygénation.....	09
<b>Figure n°10</b>	Le catabolisme de l'hémoglobine.....	11
<b>Figure n°11</b>	La répartition géographique des anomalies structurales.....	15
<b>Figure n°12</b>	La physiopathologie de la drépanocytose.....	16
<b>Figure n°13</b>	Physiopathologie de l'anémie dans les $\beta$ -thalassémies homozygotes.....	23
<b>Figure n°14</b>	Electrophorèse sur agar à pH acide des hémoglobines.....	28
<b>Figure n°15</b>	Focalisation isoélectrique des hémoglobines.....	34
<b>Figure n°16</b>	Vue microscopique des hématies falciformes.....	30

## Liste des tableaux

<b>Tableau n°01</b>	Résumé des hémoglobinopathies majeures.....	14
<b>Tableau n°02</b>	Syndromes $\beta$ -thalassémiques.....	22
<b>Tableau n°03</b>	Syndrome $\alpha$ -Thalassémiques (deux gènes pour la chaîne $\alpha$ ).....	23
<b>Tableau n°04</b>	Classification des $\alpha$ -thalassémies délétionnelles.....	25

## Liste des abréviations

**BPG** : BiPhosphoGlycérate.

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince.

**DPG** : DiPhosphoGlycérate.

**EDTA** : Ethylène-Diamine-Tétra-Acétate.

**FIV** : Fécondation In Vitro.

**NFS** : Numération Formule Sanguine.

**Hb** : Hémoglobine.

**HbF** : Hémoglobine Fœtale.

**Hp** : Haptoglobine.

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography.

**Ht** : Hématocrite.

**Kb** : Kilo Base.

**MCHC** : (CCMH): Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

**MMG** : May-Grunwald-Giemsa.

**PHHF** : Persistance Héritaire de l'Hémoglobine Fœtale.

**pO<sub>2</sub>** : Pression d'oxygène.

**PM** : Poids Moléculaire.

**SRE** : Système RéticuloEndothéliale.

**TCH** : Teneur Corpusculaire en Hémoglobine.

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

**Thal** : Thalassémie.

**VGM** : Volume Globulaire Moyen.



# ***Introduction***

L'hémoglobine, le pigment rouge du sang, son abondance et sa facilité d'isolement fait un objet de recherche depuis les temps anciens. A vrais dire, l'histoire de la chimie des protéines commence avec l'étude de l'hémoglobine. L'observation de cristaux d'hémoglobine est rapportée pour la première fois en 1840 par Friedrich Hunefeld, et en 1909 un atlas photographique de cristaux d'hémoglobine de plusieurs centaines d'espèces est publié par Edward Reichert et Amos Brown (Voet et Voet, 2005).

Les hémoglobinopathies sont le plus souvent responsables d'anémies hémolytiques. Les thalassémies et les hémoglobines anormales, dont la plus fréquente est la drépanocytose, sont endémiques dans certaines populations (origine africaine, antillaise, méditerranéenne, asiatique), mais du fait des mouvements de populations elles sont de plus en plus souvent rencontrées (Galactéros, 1995).

L'anomalie hémoglobinique est l'apparition d'une hémoglobine pathologique qui se distingue des hémoglobines normales par une modification structurale affectant certaines chaînes polypeptidiques de l'hémoglobine. Les anomalies les plus fréquentes affectent les chaînes polypeptidiques  $\beta$ , plus rarement les chaînes  $\alpha$ , exceptionnellement les chaînes  $\gamma$  ou  $\delta$ . La modification la plus habituelle est la substitution d'un acide aminé de la chaîne  $\beta$  par un autre acide aminé. C'est ainsi que dans les trois hémoglobinopathies à diffusion mondiale, la drépanocytose, l'hémoglobinosose C et l'hémoglobinosose E, l'anomalie structurale est la substitution d'un seul acide aminé des chaînes  $\beta$  de l'hémoglobine A par un autre acide aminé (Kafando et al., 2008).

L'identification d'anomalies de l'hémoglobine repose dans la majorité des cas sur l'analyse du phénotype. L'origine ethnique du patient, quelques renseignements cliniques, un hémogramme récent à distance de toute transfusion, la notion de carence martiale doivent accompagner la demande d'examen. L'électrophorèse en milieu alcalin est l'examen de première intention et permet de détecter de nombreux variants de l'hémoglobine, grâce à la visualisation de bandes anormales par rapport à des témoins normaux. Certains laboratoires lui préfèrent la focalisation isoélectrique, technique plus délicate à mettre en œuvre, mais plus résolutive. Lors de l'observation de bandes anormales, une électrophorèse en gel d'agar à pH acide doit être mise en œuvre. Les méthodes chromatographiques, sur microcolonnes notamment, permettent la quantification de différentes fractions de l'hémoglobine (Hb A2, F, S...). D'autres examens, tels les tests de falciformation, de solubilité, d'instabilité, le test de Kleihauer-Betke, sont, dans certains cas, d'utiles examens complémentaires. L'interprétation des résultats doit prendre en compte l'ensemble des données (Williams et al., 1996).

L'analyse du génotype permet un diagnostic de certitude. En outre, c'est la méthode de choix pour le diagnostic anténatal. L'identification des anomalies moléculaires relève de centres spécialisés expérimentés. Il est notamment nécessaire de disposer de sondes moléculaires correspondant aux anomalies les plus fréquemment rencontrées au sein d'un groupe ethnique donné. Il ne faut pas oublier que l'identification précise de mutations correspondant à une hémoglobine inconnue nécessite des investigations longues et coûteuses dont l'intérêt pratique est limité en l'absence de manifestations cliniques (North et al., 1995).

L'objectif de notre travail est de faire une meilleure connaissance des hémoglobinopathies et les moyens de diagnostic.

# ***Chapitre I :***

## ***Rappel sur l'hémoglobine***

Le terme hémoglobine a été utilisé pour la première fois en 1862 par Hoe-Seyler pour désigner le pigment respiratoire, contenu dans les globules rouges et permettant le transport de l'oxygène. Les hémoglobines constituent une famille très ancienne de molécules, apparue simultanément à la vie aérobie dans l'évolution des espèces. La duplication d'un gène ancestral codant pour une hémoprotéine transporteuse d'oxygène a donné naissance à deux molécules : d'une part la myoglobine, destinée au stockage d'oxygène dans les organes à proximité de son lieu de consommation, et d'autre part l'hémoglobine, spécialisée dans le transport d'oxygène de la périphérie vers les tissus (Rosa et *al.*, 1993). L'hémoglobine, hétéroprotéine de masse moléculaire 64500Da, comporte une partie non protéique, l'hème, et une fraction protéique, la globine. Il s'agit d'un tétramère composé de 4 hèmes plus 4 globines. Il existe plusieurs types d'hémoglobine, l'Hb embryonnaires, fœtale et adulte (Mehta et Hoffbrand, 2003).

### I-1 - La structure de l'hémoglobine

L'élucidation de la structure tridimensionnelle de l'hémoglobine par Perutz, a commencé en 1936. Les structures tridimensionnelles de l'hémoglobine humaine se ressemblent de façon frappante. La molécule d'hémoglobine est presque sphérique, avec un diamètre de 55Å<sup>0</sup>. Les quatre chaînes sont assemblées selon une disposition tétraédrique. Les groupes d'hème sont localisés dans des crevasses près de la périphérie de la molécule, un dans chaque sous-unité (figure 1 et 2) (Crossley et Orkin, 1993).

#### I-1-1- La structure de la globine

Elle est formée de quatre chaînes polypeptidiques appariées deux à deux. La chaîne alpha ( $\alpha$ ) comporte 141 résidus, la chaîne bêta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ) et gamma ( $\gamma$ ) sont constituées par 146 résidus; la chaîne gamma présente la particularité d'être la seule chaîne d'hémoglobine à contenir l'isoleucine (Smaili, 2003). La chaîne ainsi formée s'enroule sur elle-même en spirale pour réaliser une structure secondaire en hélice. En fait, l'hélice est discontinue, l'ensemble de la chaîne formant 8 segments hélicoïdaux (A à H) et porte une crevasse entre hélices E et F où s'insère une molécule d'hème (Rivière et Sadelain, 1997) (figure 3). Ces segments sont séparés par des courts segments non hélicoïdaux au niveau desquels se font des coudures pour donner à chaque chaîne sa forme définitive. Des liaisons de nature diverses entre acides aminés mise en évidence en contact par les courbures de la molécule la stabilisent (structure tertiaire). Enfin la réunion de 02 chaînes  $\alpha$  et de 02 chaînes  $\beta$  forme une molécule symétrique globulaire (Bernard et *al.*, 1998).

### I-1-2-La structure de l'hème

L'hème est constitué d'une partie organique et d'un atome de fer. La partie organique, la protoporphirine, est formée de quatre cycles pyrrole. Les quatre pyrroles sont unis par des ponts méthane pour former un cycle tétrapyrrole. Quatre méthyles, deux vinyles et deux propionates sont fixés sur le cycle tétrapyrrole. L'atome de fer d'hème se lie aux quatre azotes au centre du cycle protoporphirine. Le fer peut former deux autres liaisons, de part et d'autre du plan de l'hème. Ces sites de liaison sont appelés les cinquièmes et sixièmes positions de coordination (figure 4) (Diakité, 2005).

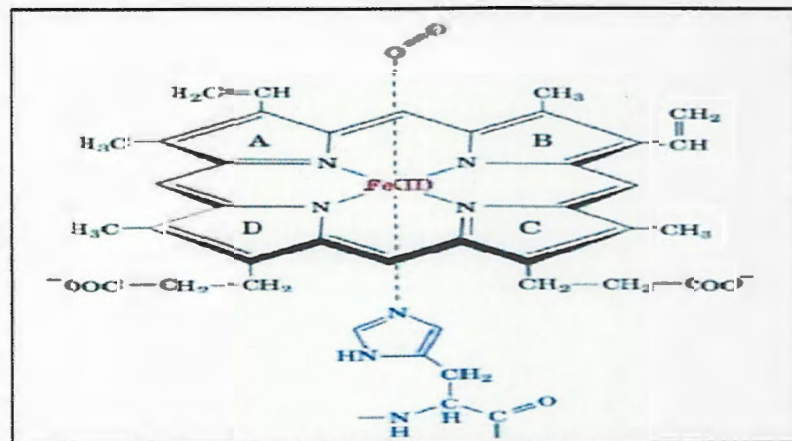


Figure 04 : Structure de l'hème (Diakite, 2005).

## I-2-Les formes de l'hémoglobine

### I-2-1- L'hémoglobine normale

Les hémoglobines des vertébrés sont constituées de quatre chaînes polypeptidique, deux chaînes de type  $\alpha$  et deux chaînes de type  $\beta$ . Il existe plusieurs types d'hémoglobine différents par la nature des deux chaînes de type  $\beta$ . Ainsi nous avons : HbA1 ( $\alpha_2\beta_2$ ), HbA2 ( $\alpha_2\delta_2$ ), HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ), HbE ( $\zeta_2\epsilon_2$ ) (Dunod, 2009).

#### A- L'hémoglobine embryonnaire

Pendant les premières semaines de la vie, l'embryon humain possède une hémoglobine embryonnaire ou HbE, de forme  $\zeta_2\epsilon_2$  : la chaîne  $\zeta$  (141 acides aminés) présente 57 différences avec  $\alpha$ , alors que la chaîne  $\epsilon$  (146 acides aminés) en comporte 34 par rapport à  $\beta$ . Cette hémoglobine embryonnaire est progressivement remplacée par son homologue fœtal (en 3 mois environ), elle-même faisant place à la forme adulte, pour disparaître 6 mois environ après la naissance (Dunod, 2009).

#### B- L'hémoglobine fœtale

Les fœtus ont leur propre type d'hémoglobine appelée hémoglobine F ( $\alpha_2\gamma_2$ ) qui diffère de l'hémoglobine adulte HbA. Une propriété importante de l'hémoglobine F est qu'elle a une affinité plus élevée pour l'oxygène dans les conditions physiologiques que l'hémoglobine A (Marshall et Bangert, 2005).



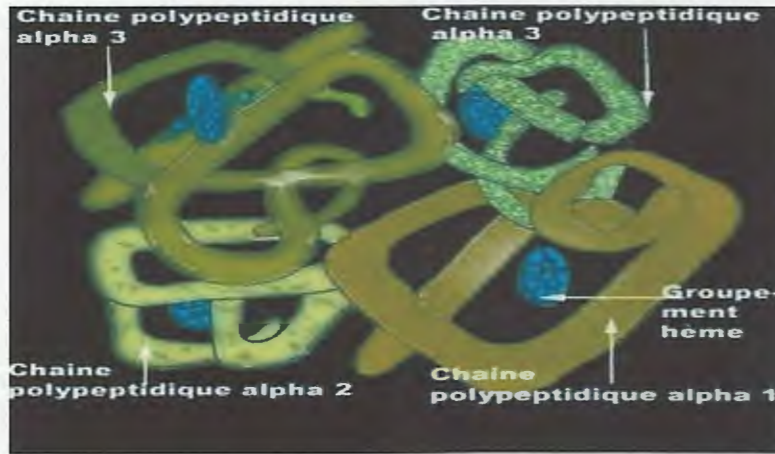


Figure01 : Structure tridimensionnelle de l'hémoglobine  $\alpha_2\beta_2$  (Mehta et Hoffbrand, 2003).

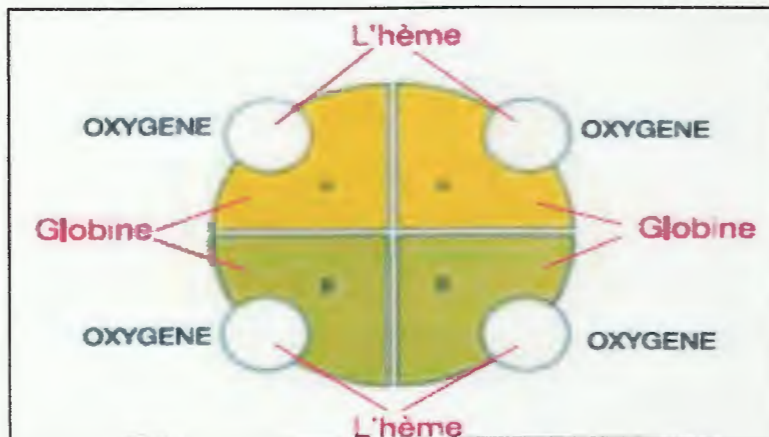


Figure 02 : molécule d'hémoglobine (Rosa et al., 1993).

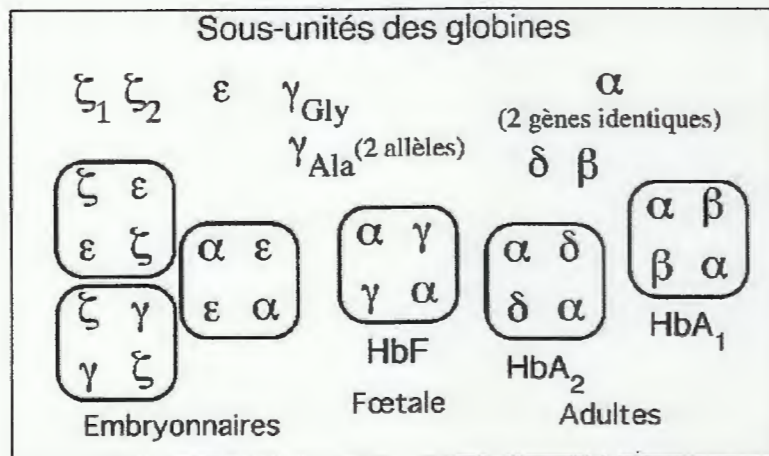


Figure 03 : les sous-unités des globines (Raisonier, 2002).



### C- L'hémoglobine adulte

Chez l'adulte, l'hémoglobine A est la principale hémoglobine, elle est constituée de deux chaînes ( $\alpha$ ) et deux chaînes ( $\beta$ ). Les adultes ont également une hémoglobine mineure appelée hémoglobine A<sub>2</sub>, qui contient des chaînes delta ( $\delta$ ) à la place des chaînes bêta ( $\beta$ ) de l'hémoglobine A<sub>1</sub> (Marshal et Bangert, 2005).

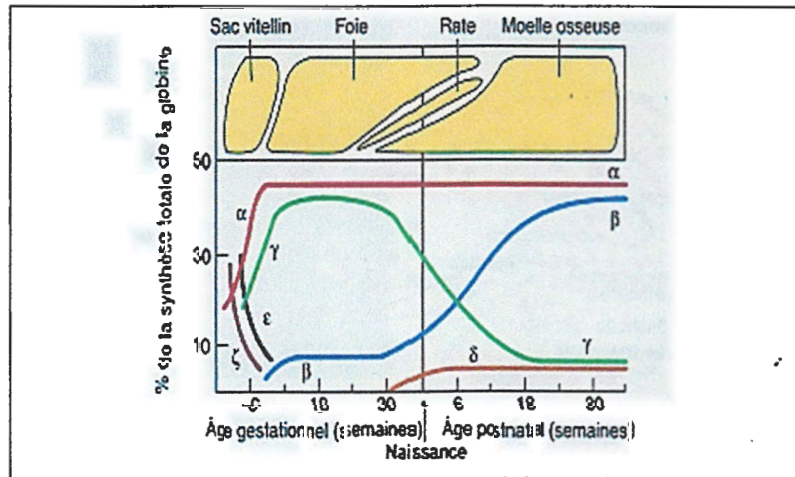


Figure 05 : Les gènes de la globine (Kamoun et Lavoine, 2003).

### I-2-2-Les hémoglobines anormales

Près de 500 hémoglobines anormales ont été décrites. Ces anomalies sont dues soit à des mutations d'une base d'ADN, de délétion ou de fusion de gène. On distingue :

**A- L'hémoglobine S**, est une hémoglobine instable en l'absence ou lorsque l'oxygène diminue. De ce fait, elle précipite dans la microcirculation ou la pression d'oxygène baisse, tout autant que dans les conditions d'anoxie (Zittoun et *al.*, 1998).

**B- L'hémoglobine C**, elle est surtout répandue en Afrique occidentale. La forme homozygote est rare (Zittoun et *al.*, 1998).

**C- L'hémoglobine D**, la plus fréquente est l'hémoglobine Punjab ( $\alpha_2\beta_2$  121 Glu  $\rightarrow$  Gln) ; elle se localise dans l'Inde du nord-ouest et se traduit par une petite anémie hémolytique microcytaire. L'hémoglobine D comme l'hémoglobine S, mais elles ont une solubilité normale et ne donnent pas de falciformation (Zittoun et *al.*, 1998).

**D- L'hémoglobine à affinité modifiée**, elles résultent d'une mutation au niveau des contacts  $\alpha_1\beta_2$ , de la cavité centrale ou de la poche de l'hème (Zittoun et *al.*, 1998).

**E- La méthémoglobine**, est une hémoglobine oxydée, dans laquelle le fer est sous forme  $Fe^{+3}$ . Elle est incapable de transporter l'oxygène. La méthémoglobinémie toxique aigue provoque des symptômes d'anémie et peut entraîner un collapsus vasculaire et la mort (Zittoun et *al.*, 1998).

**F- L'hémoglobine E**, elle est très fréquente en Asie du sud-est. Elle se traduit chez l'homozygote par une discrète anémie microcytaire hypochrome avec nombreuses cellules cibles et résistance osmotique augmentée, réalisant une forme de  $\beta^+$ -thalassémie (Zittoun et *al.*, 1998).

### I-3-La biosynthèse de l'hémoglobine

#### I-3-1- La biosynthèse de la globine

La biosynthèse de l'hémoglobine nécessite un équipement nucléaire complet qui n'existe que dans les cellules précurseur des hématies. L'hématie humaine est en effet une cellule anucléée, donc dépourvue de l'équipement informationnel et enzymatique nécessaire à la synthèse des protéines. Elle débute au stade de proérythroblaste et s'achève à celui de réticulocyte. Cette biosynthèse s'effectue selon les mécanismes généraux de la synthèse protéique ; après transcription de l'ADN en ARNm et maturation de ce dernier, on observe une migration de l'ARNm dans le cytoplasme où il sera traduit en protéine par les ribosomes selon trois étapes classiques initiation, élongation et terminaison dans lesquelles interviennent de nombreux facteurs. Dans le cas de l'hémoglobine, l'hème joue un rôle régulateur dans l'initiation. Un point important est la coordination de la biosynthèse de divers types de chaînes permettant d'obtenir une production égale de sous unités  $\alpha$  et non  $\alpha$ . Il s'agit là d'un mécanisme complexe encore incomplètement compris. Le gène  $\alpha_2$  est trois fois plus exprimé que le gène  $\alpha_1$  et il ya globalement un excès de production de 40% des ARNm  $\alpha$  par rapport à l'ARNm  $\beta$ , mais la vitesse de traduction en protéine de l'ARNm  $\beta$  étant plus rapide que celle de l'ARNm  $\alpha$ , la synthèse de deux types de sous unités est finalement équilibrée (figure 6), ainsi l'expression des gènes de globine implique des mécanismes de régulation intervenant à trois niveau spécifique tissulaire ( lignée sanguine rouge), spécifique de stade de développement (embryon, fœtus, adulte) et coordination de la synthèse des sous unités (Rosa et *al.*, 1993).

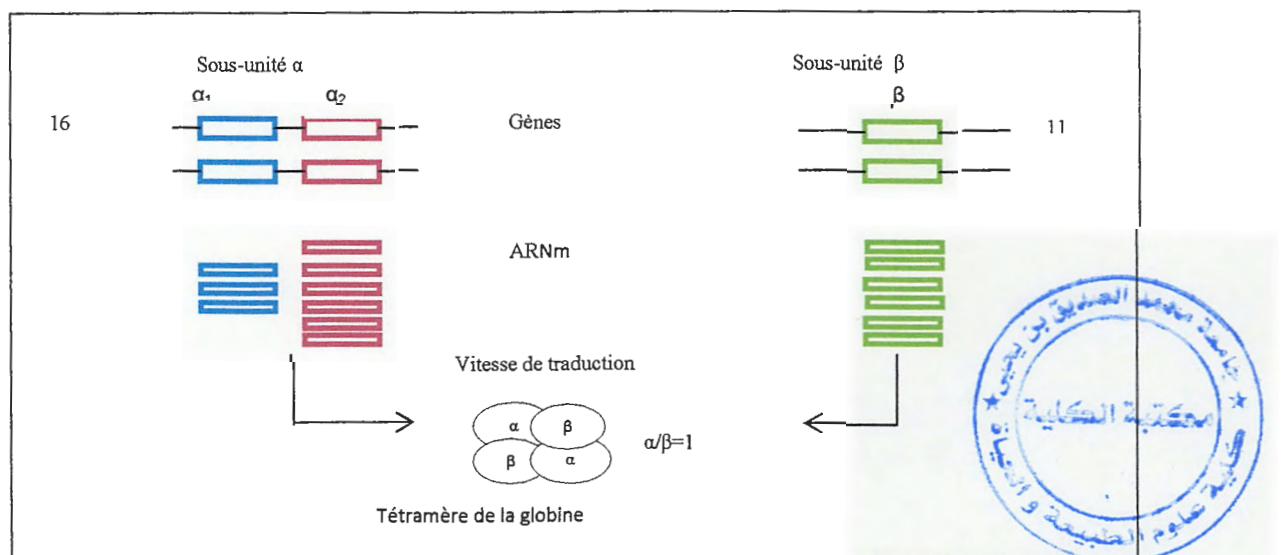


Figure 06 : coordination de la synthèse des sous-unités de globine (Rosa et *al.*, 1993).

#### I-3-2-La biosynthèse de l'hème

La biosynthèse de l'hémoglobine est coordonnée à celle de l'hème, qui s'effectue d'une part dans la mitochondrie, d'autre part dans le cytosol. Les diverses réactions enzymatiques de cette chaîne métabolique, la première réaction, qui conduit à la formation du  $\delta$ -ALA-S, dont le coenzyme est le phosphate de pyridoxal, dérivé de la vitamine B<sub>6</sub>, occupe une position clé dans cette séquence réactionnelle. Dans la fois, la synthèse et l'activité de cette enzyme sont soumises à un rétrocontrôle par l'hème, produit final de la chaîne métabolique. Une forme spécifique de

cellules érythroïtiques (e ALA-S ou ALA-S<sub>2</sub>) est codée par un gène présent sur chromosome X. Cette isoforme érythroïde présente une régulation particulière, adaptée au taux de synthèse d'hème élevé dans ces cellules. L'ARNm-e ALA-S possède dans sa région 5' non codante, un motif de type IRE qui régule la synthèse de l'enzyme en fonction des apports en fer. C'est ensuite dans le cytosol que s'effectuent les autres réactions conduisant au prophobilinogène, à l'uro-porphyrinogène et au coproporphyrinogène. Les réactions suivantes sont à nouveau intramitochondriales : transformation protoporphyrinogène, puis en protoporphyrine IX sur laquelle s'accroche l'atome de Fer. L'hème quitte alors la mitochondrie pour se fixer à la chaîne de globine en croissance. L'hème stimule activement la synthèse des chaînes de globine (Bach et al., 1929).

#### I-4-Les groupes de gènes qui codent pour l'hémoglobine

##### I-4-1-Le groupe des gènes de type $\alpha$

Il est localisé sur le chromosome 16. Il comprend, de 3' à 5' (sur une petite séquence de DNA de 35Kb) : deux gènes de structure  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , fonctionnels dès la vie embryonnaire ; un gène de structure  $\zeta$  permettant la formation des chaînes  $\zeta$  (qui remplacent les chaînes  $\alpha$  au cours des premières semaines de la vie embryonnaire). Chez un sujet normal, les gènes  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  sont dupliqués. Il existe donc quatre gènes de Structure  $\alpha$  pour une paire de chromosomes. En revanche, les gènes  $\alpha_2$  sont trois fois plus exprimés que les gènes  $\alpha_1$  (figure 07) (Sabelain, 2003).

##### I-4-2-Le groupe des gènes de types $\beta$

Il est localisé sur le bras court du chromosome 11 (dans un fragment de DNA de 6Kb) et il comprend de 3' vers 5' : un gène  $\beta$ , dont l'expression débute à la fin du premier trimestre de gestation ; un gène  $\delta$ , fonctionnel après la naissance ; deux gènes  $\gamma A$  et  $\gamma G$  qui diffèrent par la variation d'un acide aminé en position 136 de la chaîne fœtale (Glycine et Alanine) ; un gène  $\epsilon$  embryonnaire. Le gène  $\beta$  n'est pas dupliqué, contrairement aux gènes  $\alpha$ . Les lésions qui touchent les gènes  $\beta$  s'expriment : si un seul gène est atteint pour 50% de l'hémoglobine totale ; si aucun des deux gènes n'est fonctionnel pour 100% de l'hémoglobine totale (Sabelain, 2003).

En conséquence, la plupart des lésions qui portent sur le gène  $\beta$  sont plus sévères que celles qui touchent les gènes  $\alpha$ . Pour chacun des groupes de gènes ( $\alpha$  et  $\beta$ ), il est possible de mettre en évidence des pseudogènes qui représentent des analogies avec les gènes de groupe considéré mais qui ne sont pas fonctionnels. Des structures participent au contrôle de l'activité des gènes comme les sites de reconnaissances de l'ARNm polymérase permettant la transcription ou des enzymes de clivage des introns et d'épissage des exons (figure 7) (Sabelain, 2003).

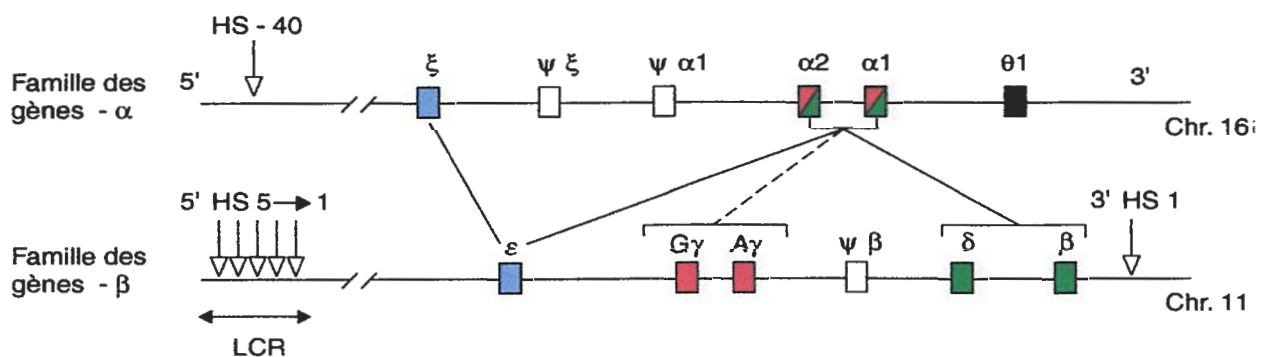


Figure 07 : Organisation des gènes globines (Labie et Elion, 2005).



## I-5- Les fonctions de l'hémoglobine

### I-5-1-Le transport de l'oxygène

L'hémoglobine est un pigment respiratoire des globules rouges, l'Hb assure plusieurs fonctions dont la principale est le transport d'oxygène des poumons aux tissus (Bach et *al.*, 1929). L'oxygène est peu soluble dans l'eau et nécessite de ce fait un transporteur dans le sang c'est l'hémoglobine. Une molécule d'hémoglobine a quatre sites de liaison pour l'O<sub>2</sub> ; elle peut donc transporter 4 molécules d'O<sub>2</sub> à la fois. La liaison avec l'oxygène est réversible. A haute pression partielle d'oxygène, l'hémoglobine se charge en oxygène. Lorsque la pression partielle est basse, elle libère l'oxygène. La libération d'O<sub>2</sub> est aussi importante que sa fixation dans le rôle de l'hémoglobine. La liaison de l'oxygène à l'ion Fe<sup>+2</sup> est une oxygénation, l'oxygénation ne modifie pas la valence du fer. Lorsque l'hémoglobine est oxygénée, on l'appelle oxyhémoglobine elle, est de couleur rouge clair c'est le cas dans le sang artériel. Lorsque l'hémoglobine a libéré son oxygène, on l'appelle désoxyhémoglobine, sa couleur est rouge foncé ; ceci s'observe dans le sang veineux (Horn et *al.*, 2005).

#### - Le fer

La fonction respiratoire de l'hémoglobine est liée à la présence de fer dans sa molécule ; le fer est l'élément caractéristique de l'Hb. Sans un apport convenable de fer l'Hb ne peut être synthétisée en quantité suffisante. Le rôle du fer dans de nombreuses enzymes explique que la carence en fer ne se réduise pas à la seule diminution de la synthèse hémoglobinique, mais se comporte comme un grande carence métabolique, dont les conséquences se font sentir dans de nombreuses activités physiologique, en dehors du rôle, cependant essentiel dans le mécanisme de l'hématose (Orsini et *al.*, 1982).

#### - Le DPG

Le 2,3-diphosphoglycérate (DPG), également connu sous le nom de 2,3-bisphosphoglycérate (BPG), se lie à l'hémoglobine et a un grand effet sur son affinité pour l'O<sub>2</sub>, ce phosphate organique très anionique est présent dans les globule rouges humains, à peu près à la même concentration molaire que l'hémoglobine (Horn et *al.*, 2005).

#### • La régulation de la fixation d'oxygène

L'hémoglobine est une protéine allostérique. La fixation d'une première molécule d'O<sub>2</sub> modifie la conformation de la protéine qui facilite la fixation de la molécule d'O<sub>2</sub> suivant. L'affinité pour l'oxygène croît avec le nombre de molécules d'O<sub>2</sub> fixée. Ce phénomène est appelé interaction coopérative (Horn et *al.*, 2005).

#### • La courbe de saturation

La relation entre la pression partielle d'O<sub>2</sub> et le pourcentage de saturation de l'hémoglobine n'est pas linéaire, un fait d'extrême importance physiologique. Le doublement de la pression partielle d'O<sub>2</sub> n'entraîne pas le doublement de la saturation de l'hémoglobine.

La relation a la forme d'une sigmoïde connue sous le nom de courbe de dissociation (ou de saturation) de l'hémoglobine. A son extrémité supérieure, entre 60 et 100 mm Hg de pO<sub>2</sub>, la courbe est en plateau. Dans cette étendue de variation de la pO<sub>2</sub>, l'augmentation de la pO<sub>2</sub> entraîne peu de changement de la saturation. Par contraste entre 0 et 60 mm Hg, un faible changement de pO<sub>2</sub> a beaucoup d'effet sur la saturation de l'hémoglobine ; ce qui correspond à la partie abrupte de la courbe. Tant le plateau supérieur que la partie abrupte de la courbe sont importants en physiologie (figure 08) (Sherwood, 2006).

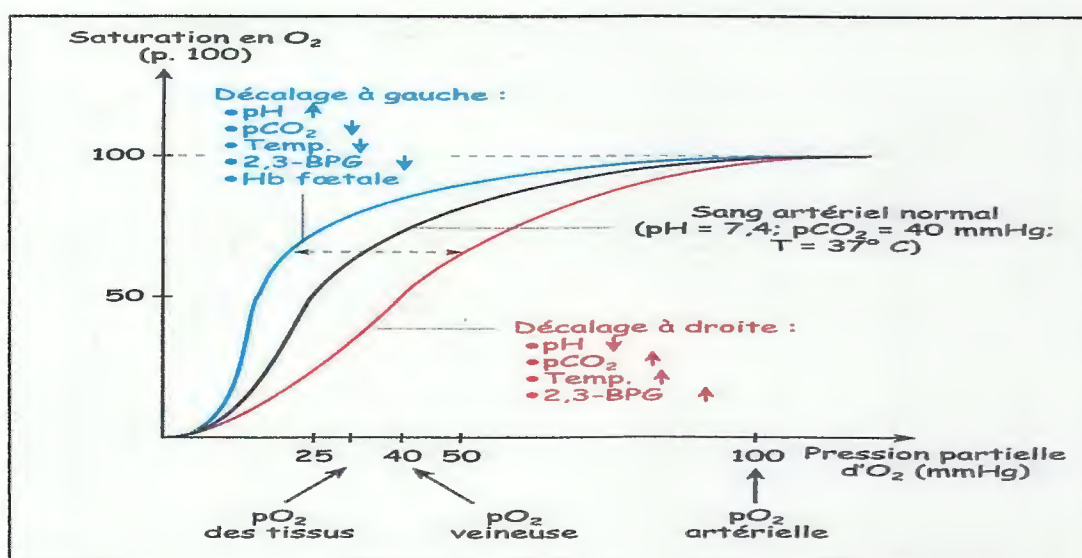


Figure 08 : Courbe de saturation de l'Hb en oxygène (Horn et al., 2005).

• Les deux états de l'hémoglobine

Dans l'oxyhémoglobine, les résidus carboxy- terminaux des quatre chaînes ont une liberté de rotation presque complète. Dans la désoxyhémoglobine, par contre, ces groupes terminaux sont fixés. La structure quaternaire de la désoxyhémoglobine est dénommée forme T (Tendue) ; celle de l'oxyhémoglobine, forme R (relâchée) (figure 09) (Lehninger et al., 2000).

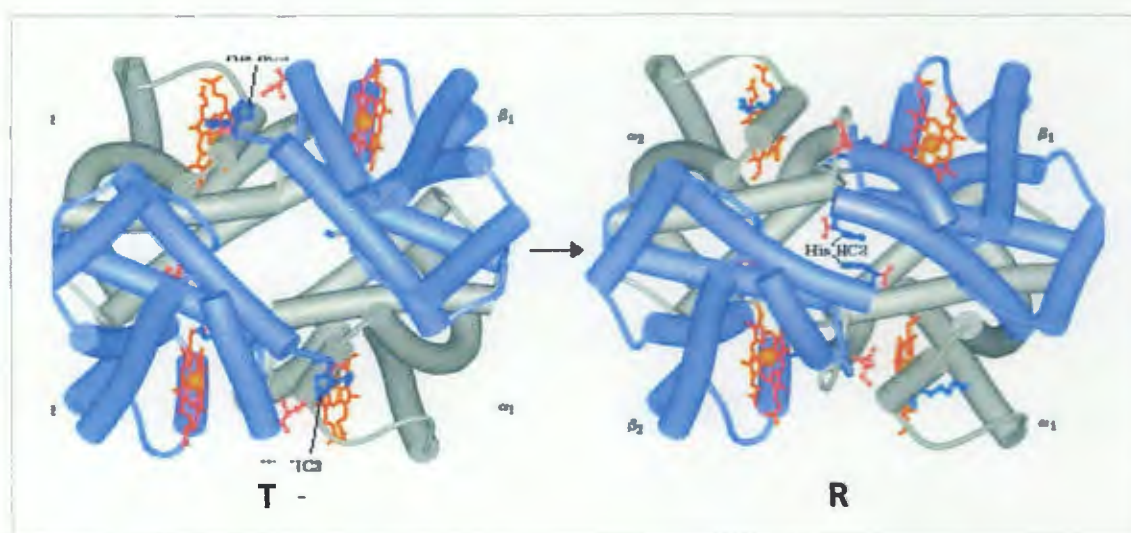


Figure 09 : Modification de la conformation de l'hémoglobine après oxygénation (Lehninger et al., 2000).

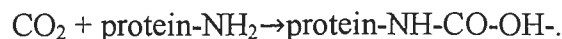
• Les facteurs modifiant l'affinité pour l'oxygène (O<sub>2</sub>)

Trois facteurs interviennent dans la régulation de la fonction respiratoire de l'hémoglobine ; le pH responsable de l'effet Bohr, l'anhydride carbonique et les esters phosphoriques plus particulièrement le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG). L'effet Bohr est bien connu : l'affinité pour l'O<sub>2</sub> est diminuée en milieu acide, elle est augmentée en milieu alcalin. L'anhydride carbonique agit indirectement en modifiant l'affinité pour l'O<sub>2</sub> par effet Bohr, en tant qu'acide et exerce également une action directe par un mécanisme encore mal connu en se fixant sur la partie protéique de la molécule d'Hb. Le 2,3-DPG, synthétisé au niveau du Shunt de

Rapport-Leubering qui est une dérivation de la voie glycolytique classique, à la propriété, quand il se fixe sur l'Hb, de diminuer son affinité pour l'O<sub>2</sub> (déplacement de la courbe de dissociation vers la droite (figure 08) et par conséquent de faciliter la libération de l'oxygène au niveau tissulaire. Le 2,3-DPG agit ainsi en tant que régulateur des propriétés allostériques de l'Hb en modulant l'affinité de celle-ci pour l'O<sub>2</sub> : il se fixe dans la cavité centrale de l'Hb lorsque ce pigment est à l'état désoxygéné. Lorsque l'hémoglobine est oxygénée, l'oxygénation induit une modification conformationnelle de la molécule de telle manière que la poche centrale ne peut accepter le 2,3-DPG (Orsini et *al.*, 1982).

### I-5-1-Le transport du dioxyde de carbone

Le gaz carbonique (ou anhydride carbonique) peut se combiner avec l'hémoglobine pour donner la carbhémoglobine, mais l'hème n'intervient pas, car la fixation du CO<sub>2</sub> a lieu sur les groupements basiques de la globine ; elle se fait d'ailleurs sur ceux d'autres protéines également (mais il faut se souvenir que l'hémoglobine représente environ 75% des protéines totales du sang). Environ ¼ du CO<sub>2</sub> transporté dans le sang voyage sous forme de carbamino-protéine :



Ces dangés peuvent être évités grâce au pouvoir tampon des protéines sanguines qui peuvent fixer des ions H<sup>+</sup>, permettant ainsi à d'avantage de H<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> d'être ionisé et par conséquent à d'avantage de CO<sub>2</sub> d'être dissous. Au contraire, lorsque le sang arrive aux poumons, le CO<sub>2</sub> est libéré, et les réactions ont lieu en sens inverse ; les protéines sont à nouveau prêtes à fixer des ions H<sup>+</sup>. Il est bon de voir ici comment s'effectue d'une manière générale le transport du CO<sub>2</sub> depuis les tissus où il est formé jusqu'aux poumons ou il est éliminé. Ce transport doit se faire de façon à éviter, d'une part, une acidification progressive du sang au fur et à mesure qu'il traverse les tissus libérant du CO<sub>2</sub>, et d'autre part, la formation de bulles de CO<sub>2</sub> car la solubilité de ce gaz est relativement limitée. Il faut noter que le système H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ↔ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> est un système tampon et qu'il est en grande partie responsable (avec le système H<sub>2</sub>P<sub>4</sub><sup>-</sup> ↔ HPO<sub>4</sub><sup>-</sup>) de la protection du sang contre les excès d'acide ou de base (Grosseley, 1993).

### I-6- Le catabolisme

Par utilisation des différents constituants radiomarqués de l'hémoglobine (globine, fer ou hème) il a été possible de montrer que :

- La durée de vie des hématies circulantes chez l'homme est de 120 jours environ ;
- Le vieillissement des hématies est dû à l'épuisement des enzymes de la glycolyse ;
- Au cours du vieillissement, les propriétés antigéniques se modifient et les hématies sont phagocytées par le système réticuloendothélial (SRE) ;
- La destruction des hématies s'effectue dans le SRE, surtout au niveau du foie, de la moelle osseuse et de la rate : l'hémoglobine est libérée ;
- La dégradation de l'hémoglobine donne naissance pour l'hème aux pigments biliaires (bilirubine), alors que la globine suit le sort des protéines.

Une hémolyse intravasculaire entraîne la libération d'hémoglobine (Hb) qui est captée par l'haptoglobine (Hp). Le complexe Hp-Hb est mené aux cellules du SRE pour la dégradation de l'hémoglobine (Stryer, 2003). Une grande partie de la bilirubine est réabsorbée par l'intestin puis transformée en urobililine éliminée par l'urine ou en strobililine éliminée par les selles (Binet, 1990).



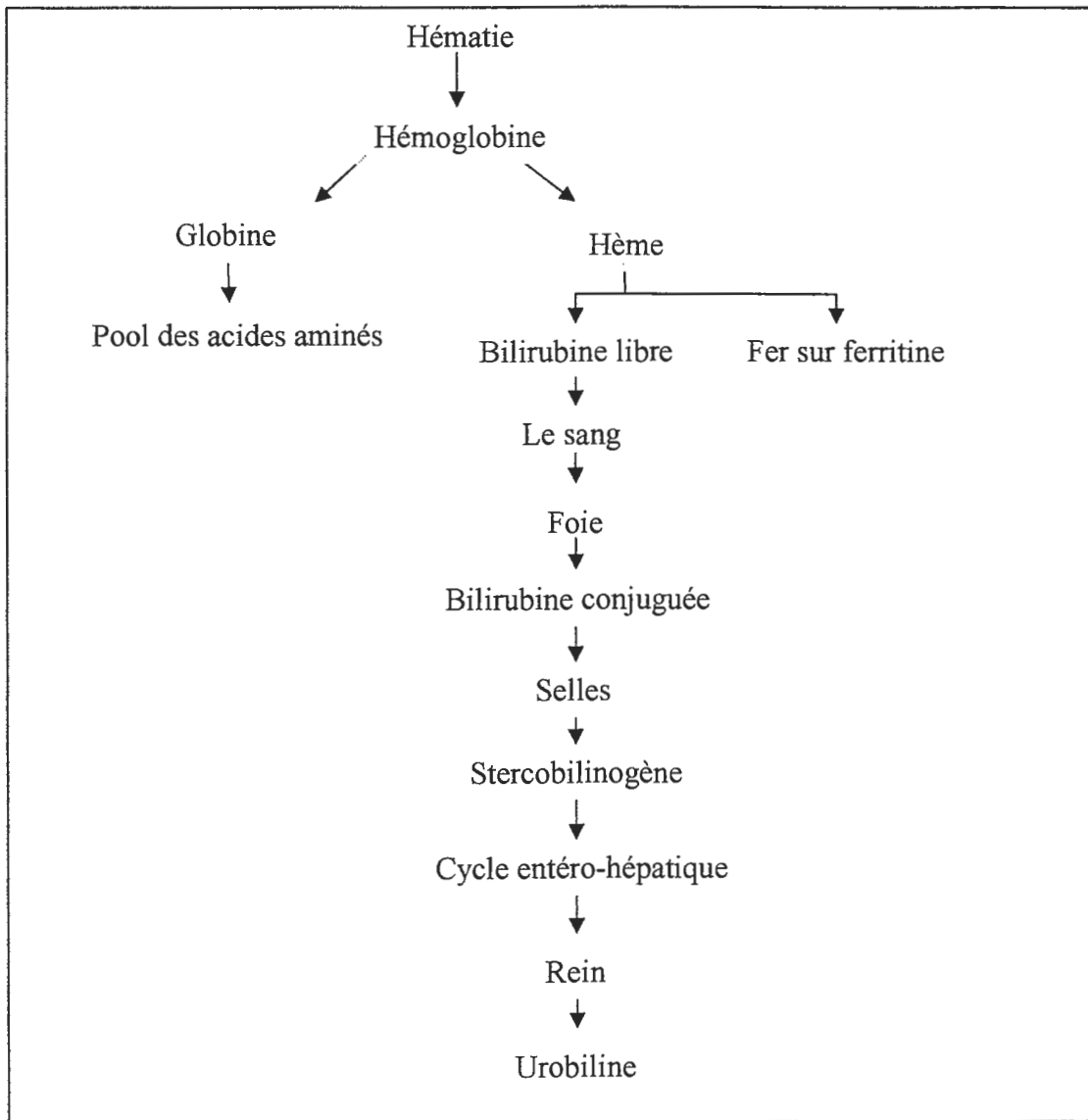


Figure10 : Le catabolisme de l'hémoglobine (Binet, 1990).

***Chapitre II :***

***Les hémoglobinopathies***

Les désordres des hémoglobines humaines, ou hémoglobinopathies, occupent une position unique en génétique médicale pour plusieurs raisons : elles sont les maladies génétiques les plus fréquentes dans le monde et elles sont responsables d'une morbidité substantielle. L'organisation mondiale de la santé a estimé qu'environ 5 % de la population mondiale était porteuse de mutations génétiques conduisant à des maladies de l'hémoglobine et qu'environ 1/3 de million d'homozygotes sévèrement atteints ou hétérozygotes composites naissent chaque année. De plus, parce que l'hémoglobine a été l'une des premières protéines dont la structure a été élucidée et parce que les gènes de la globine ont été les premiers à être clonés, leur pathologie moléculaire est mieux comprise que celle d'un grand nombre d'autres maladies génétiques (Margaret et al., 1992). Elles sont responsables de la grande majorité des anémies hémolytiques congénitales, dues à une mutation d'un des gènes, alpha ( $\alpha$ ) ou bêta ( $\beta$ ), codant pour l'hémoglobine adulte normale A (Bouvenot et al., 1995).

## II-1- les Types d'hémoglobine anormale

**-Extérieure modifiée :** presque toutes les substitutions à la surface des molécules d'hémoglobine sont sans inconvénient l'hémoglobine S est une exception frappante (Weinman et Kamoun, 2009).

**-Site actif modifié :** la sous-unité défectueuse ne peut pas fixer l'oxygène en raison d'un changement structural au voisinage de l'hème qui affecte directement la fixation de l'oxygène. Par exemple, la substitution de la tyrosine à l'histidine proximale ou à l'histidine distale a pour effet la stabilisation de l'hème dans sa forme ferrique, qui ne peut plus fixer l'oxygène. La chaîne latérale tyrosine est ionisée dans ce complexe avec l'ion ferrique de l'hème. Les hémoglobines des mutants caractérisées par un état ferrique permanent de deux des hèmes sont appelées hémoglobine M. La lettre M signifie que les chaînes modifiées sont sous forme méthémoglobine (ferrihémoglobine). Les maladies sont habituellement cyanosées. La maladie n'a été vue que dans la forme hétérozygote, car la forme homozygote serait presque certainement létale (Weinman et Kamoun, 2009).

**-Structure tertiaire modifiée :** la substitution de l'acide aminé devance la chaîne polypeptidique de se replier en sa conformation normale. Ces hémoglobines sont habituellement instables, par exemple, dans l'hémoglobine Hammersmith, la phénylalanine adjacente à l'hème, est remplacée par la sérine. L'affinité de cette hémoglobine pour son groupe hémique est beaucoup plus faible que normalement. Les substitutions d'acides aminés au niveau de sites éloignés de l'hème peuvent également empêcher la molécule de se replier en sa conformation normale. Un mutant instructif est l'hémoglobine Riverdale-Bronx, qui a une arginine à la place de la glycine au niveau de  $\beta 6$ . La glycine occupe cette position dans toutes les myoglobines et hémoglobines normales connues. Cette hémoglobine de mutant ne se replie pas normalement parce que l'arginine au niveau de  $\beta 6$  est trop large pour s'insérer dans l'étroit espace entre les hélices B et E (Weinman et Kamoun, 2009).

**-Structure quaternaire modifiée :** quelques mutations aux interfaces entre les sous-unités conduisent à une perte des propriétés allostériques. Ces hémoglobines ont habituellement une affinité pour l'oxygène anormale. La région de contact  $\alpha_1\beta_2$  qui se modifie considérablement au cours de l'oxygénation est particulièrement vulnérable aux effets des mutations (Weinman et Kamoun, 2009).

## II-2- Les Différents types de mutation

### -Mutations de la poche de l'hème

L'importance de la poche de l'hème fait que toute mutation de cette zone a une traduction pathologique. Dans les hémoglobines M, le fer de l'hème est oxydé en  $Fe^{3+}$ . Les

hémoglobines perdant leur hème sont instables, entraînant une anémie hémolytique. Enfin, l'affinité pour l'oxygène peut être modifiée, ce que traduit une polyglobulie (affinité augmentée) ou une cyanose (affinité diminuée) (Labie et Elion, 2005).

#### **-Mutations des zones de contact**

Des mutations peuvent toucher les zones de contact entre les sous-unités. Les résidus du contact  $\alpha_1\beta_1$  étant responsables de la stabilité de la molécule, leur mutation se traduira par une Hb instable et une anémie hémolytique. Ceux du contact  $\alpha_1\beta_2$  étant le siège de la transition allostérique, une anomalie dans leur région produit une Hb à affinité modifiée pour l'oxygène (Labie et Elion, 2005).

#### **-Mutation de la cavité centrale**

Quelques mutations ont été décrites, touchant les résidus de la cavité centrale, extrémité des chaînes polypeptidiques impliquées dans les ponts salins qui stabilisent la forme désoxygénée de la molécule, sites de fixation du 2,3-DPG. Chez ces variantes, l'affinité pour l'oxygène est le plus souvent augmentée (Labie et Elion, 2005).

### **II-3-Les classes de l'hémoglobinopathie**

Les anomalies de l'hémoglobine peuvent être classées en deux grandes catégories :

**-Les anomalies structurales**, dans lesquelles la molécule d'hémoglobine est altérée.

**-Les thalassémies**, elles sont des groupe d'affections dans lesquelles soit les chaînes d' $\alpha$ -globine, soit les chaînes de  $\beta$ -globine sont structurellement normales mais en quantités réduites. Une autre affection, la persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale, survient lorsque cette dernière, codée par les gènes de l' $\alpha$ -globine et par des gènes codant pour une forme voisine de la  $\beta$ -globine dénommés  $A\gamma$  et  $G\gamma$ , continue à être produite après la naissance (normalement, la production des chaînes  $\gamma$  s'interrompt et celle des chaînes  $\beta$  commence au moment de la naissance). La persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale ne provoque pas de maladie, mais peut au contraire compenser le manque d'hémoglobine adulte normale (tableau 1) (Lévy et *al.*, 2008).

Tableau 01 : Résumé des hémoglobinopathies majeures (Lévy et *al.*, 2008).

Maladie	Type de mutation	Caractéristiques principales de la maladie
Drépanocytose	Mutation faux-sens de la $\beta$ -globine	Anémie, infarctus tissulaires, infections
Maladie Hb H (Hémoglobinose H)	Délétion ou anomalie de trois des quatre chaînes de l' $\alpha$ -globine	anémie modérément sévère, splénomégalie
$\alpha$ -thalassémie majeure avec présence d'Hb Bart	Délétion ou anomalie des quatre chaînes de $\alpha$ -globine	Anémie sévère ou hypoxémie, insuffisance cardiaque congestive ; mortinatalité ou décès néonatal
$\beta^0$ -thalassémie	Généralement des mutations non-sens, par décalage du cadre de lecture, ou de site donneur ou accepteur des sites d'épissage, aucune production de $\beta$ -globine	Anémie sévère, splénomégalie, anomalies squelettiques, infections ; généralement fatale au cours de la première décennie si elle n'est pas traitée
$\beta^+$ -thalassémie	Généralement mutation faux-sens, des séquences de régulation, ou des séquences consensus des sites d'épissage ou des sites d'épissage cryptique ; faible production de $\beta$ -globine	Caractéristiques similaires à celles de la $\beta^0$ -thalassémie mais souvent légèrement moins graves

### II-3-1- Les anomalies structurales de l'hémoglobine

Les anomalies de structure ont pour chef de file la drépanocytose ou anémie à hématies falciformes, ainsi, L'hémoglobinose C, l'hémoglobinose D, l'hémoglobinose E, l'hémoglobinose M, l'hémoglobinose SC, l'hémoglobine  $\beta$  thalasso-drépanocytose et les hémoglobines instables avec propension à la précipitation (Siguret et Andreux, 1997).

L'hémoglobinose S ou drépanocytose est de loin l'anomalie de l'hémoglobine la plus fréquemment observée. Elle atteint surtout les populations originaires des régions suivantes : Afrique noire, Madagascar, Réunion, Antilles, Amérique centrale, bassin méditerranéen, Proche-Orient (Giroit et *al.*, 2001).

L'hémoglobinose C, qui vient en seconde position en termes de fréquence, est représentée chez les Africains mais aussi chez les noirs américains et les Maghrébins (Loustau et *al.*, 2011).

L'hémoglobinose E, atteint surtout les populations des pays du Sud-est asiatique, notamment khmères : Cambodge, Laos, Thaïlande et Birmanie ; elle semble plus rare au Viêt-Nam (Loustau et *al.*, 2011).



Les Hb D, plus rares, forment un groupe hétérogène dont la plus connue est l'HbD Punjabi : elles sont rencontrées en Inde, dans le bassin méditerranéen et chez les Noirs américains (figure8) (Loustau *et al.*, 2011).

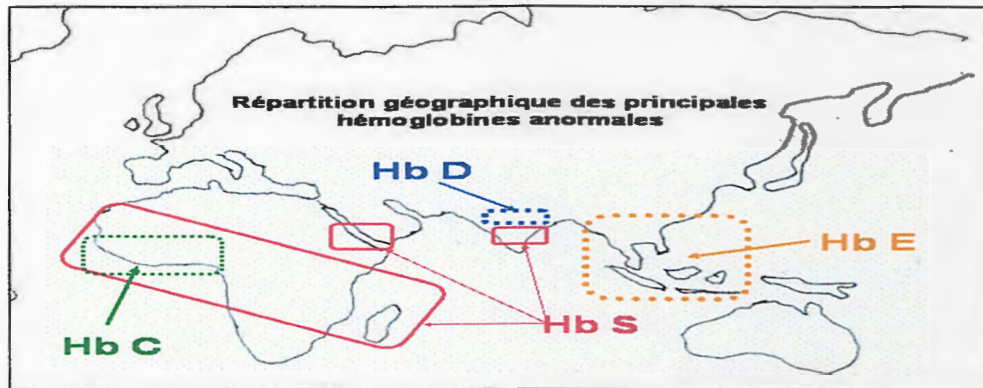


Figure 11 : La répartition géographique des anomalies structurales (Zandecki, 2006).

### II-3-1-1-La drépanocytose

C'est la Première maladie moléculaire décrite en 1949, son étude a été entreprise par des abords multiples. La drépanocytose, ou anémie falciforme, est une maladie héréditaire récessive autosomique. Cette maladie est un syndrome hémolytique dû à un défaut de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine. Elle caractérise par une tendance des globules rouges à prendre une forme anormale, en faucille (d'où son nom d'anémie «falciforme»). Ces hématies rigides se bloquent dans les petits vaisseaux et y forment des agglutinats qui sont source d'infarctus douloureux et entraînent une hypoxie d'aval entretenant le phénomène de falciformation (Bardakjian *et al.*, 2000).

#### A- La physiopathologie

L'hémoglobine S est une hémoglobine anormale résultant d'une mutation ponctuelle du 6<sup>ème</sup> acide aminé de la chaîne  $\beta$  de la globine : l'acide glutamique est remplacé par la valine. Le codon normal GAG en position 6 est remplacé par le codon GUG. Cette mutation ponctuelle entraîne une modification de la conformation spatiale de l'hémoglobine S. Il se forme un pont entre la première valine et la sixième valine sur la chaîne  $\beta$  de la globine aboutissant à l'état désoxygéné à une polymérisation des molécules. De longues fibres d'HbS rigides et insolubles se forment donnant une gélification. Les érythrocytes perdent leur déformabilité et leur plasticité et prennent un aspect caractéristique en faucille (drépano ou sickle). Les molécules d'Hb polymérisées mènent à la falciformation des érythrocytes, lesquels peuvent se trouver coincés dans les petits vaisseaux sanguins, causant ainsi une vaste gamme de complications graves sur le plan clinique et une hausse du taux de mortalité chez les personnes affectées. Cette hématie de forme anormale tend à se bloquer dans les petits vaisseaux formant des thromboses ; le trouble circulatoire qui en résulte aggrave la désaturation locale en oxygène et par conséquent la falciformation (figure 11) (Bouvenot *et al.*, 1995).





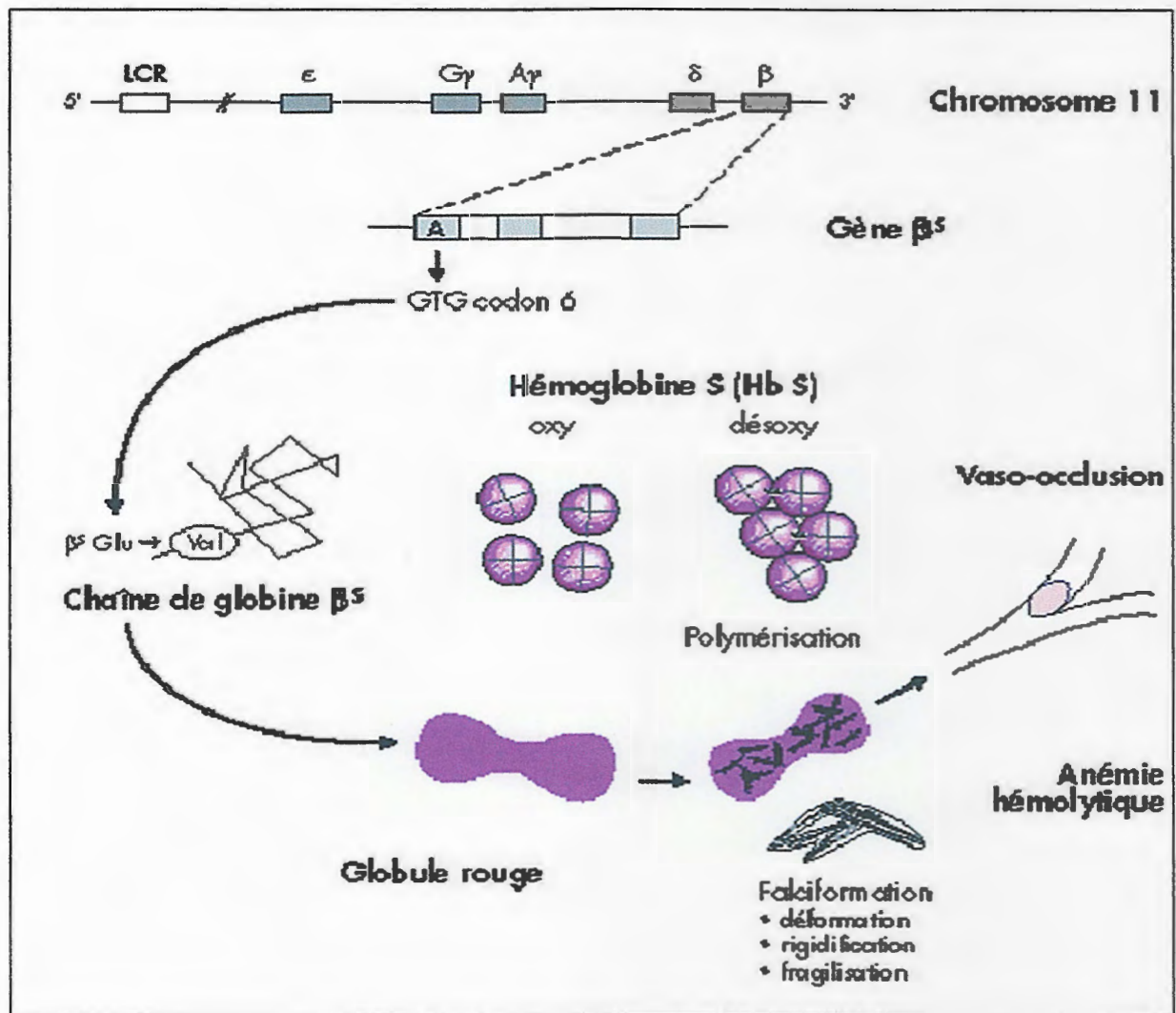


Figure 12 : La physiopathologie de la drépanocytose (Labie et Elion, 2005).

## B- L'aspect clinique

### a- La drépanocytose homozygote

La drépanocytose homozygote ou anémie drépanocytaire débute entre 6 mois et 2 ans, après la disparition de l'hémoglobine fœtale (Boulanger et *al.*, 1977). Les premiers signes cliniques n'apparaissent qu'après l'âge de six mois, période où l'hémoglobine S remplace progressivement l'hémoglobine F. Le tableau clinique comporte trois sortes de situations : les phases stationnaires, les complications aiguës et les complications chroniques (Aubry et Gauzère, 2011).

- **Les phases stationnaires :**

A l'état basal, il existe une anémie qui se traduit par une pâleur cutanéomuqueuse puis par des signes cardiaques. La splénomégalie est constante chez le nourrisson puis régresse. L'hépatomégalie est inconstante. Il existe un retard staturo-pondéral chez les enfants en zone tropicale et souvent un retard de la puberté et de la maturation osseuse (Aubry et Gauzère, 2011).

- **Les complications aiguës :**

Les crises douloureuses aiguës, appelées crises drépanocytaires, associent des douleurs à de la fièvre. Elles sont fréquentes chez le petit enfant mais s'espacent au cours de

l'adolescence. L'hétérogénéité des symptômes (thoraciques, abdominaux...) génère des problèmes diagnostiques. Les infections ont une forte incidence dans les premières années de vie et diminuent, sans disparaître, avec l'âge. Elles sont responsables d'une part importante de la morbidité et de la mortalité de la drépanocytose. Ce sont des méningites, des septicémies, des pneumopathies, des ostéomyélites (Aubry et Gauzère, 2011).

Des épisodes d'aggravation de l'anémie chronique peuvent résulter d'une situation fébrile, de crises de séquestration splénique (particulières au petit enfant), d'une infection par le parvovirus B19. Les accidents vaso-occlusifs graves sont des complications aiguës qui comportent des manifestations neurologiques, pulmonaires, des thromboses (thrombose de l'artère centrale de la rétine, priapisme...) et des hématuries microscopiques (Aubry et Gauzère, 2011).

- **Les complications chroniques**

Elles sont fréquentes pendant l'adolescence et la vie adulte. Ce sont des ulcères de jambe, des nécroses osseuses aseptiques (des hanches par exemple), des lésions oculaires (rétinopathie avec hémorragies), des complications pulmonaires (infarctus, infections, insuffisance respiratoire chronique), des atteintes cardiaques, des altérations rénales, des complications hépatobiliaires lithiase biliaire). Il été trouvé des corrélations entre l'évolution clinique et le taux d'hémoglobine F. Les sujets ayant le plus d'hémoglobine F (supérieure à 20 %) ont une forme moins sévère (Bernard et *al.*, 1998).

#### **b- La drépanocytose hétérozygote**

La drépanocytose hétérozygote est en général un état asymptomatique. Des symptômes évocateurs de syndrome drépanocytaire (hémolyse, douleurs) doivent faire rechercher un facteur aggravant associé (Hétérozygotie A/S Antilles). Le trait drépanocytaire expose toute fois à une atteinte rénale (hématuries, défaut du pouvoir de concentration des urines...), certaines manifestations vaso-occlusives comme l'infarctus splénique, dans des conditions d'hypoxémie profonde par exemple (Bernard et *al.*, 1998).

Il existe aussi d'autre syndromes drépanocytaires tels que : Les doubles hétérozygotes SC qui sont Fréquents aux Antilles ont une hémolyse chronique avec splénomégalie est surtout des thromboses (osseuses, oculaires, spléniques) de fréquence très variable. Le principal risque chez ces sujets est la nécrose aseptique osseuse nécessitant parfois des interventions orthopédique. La grossesse est souvent compliquée ; Les doubles hétérozygotes SD ont une symptomatologie voisine mais plus atténuée ; Les doubles hétérozygotes HbS- $\beta$ - thalassémie caractérisé par une anémie microcytaire franche, mais moins de complication hémolytique et thrombosantes que les HbS homozygotes ou les Hb SC (effet protecteur de l'HbF) (Bernarde et *al.*, 1998).

#### **II-3-1-2-l'hémoglobinoase E**

L'hémoglobinoase E est la seconde hémoglobinopathie dans le monde après l'hémoglobinopathie S, elle est considérée par DJ Weatherall comme l'hémoglobine anormale la plus fréquente au monde. Elle est due au remplacement d'un acide glutamique par une lysine. Comme la drépanocytose, l'hémoglobinopathie E confère une certaine résistance au paludisme (Voet et Voet, 2005).

La mutation à l'origine de l'hémoglobine E modifie la séquence nucléotidique au voisinage du site normal d'épissage et dévoile ainsi un site d'épissage cryptique, normalement non utilisé. Ce site d'épissage caché décale le cadre de lecture et conduit ainsi à rencontrer

précocement un signal de terminaison. Ainsi l'hémoglobine E est responsable d'un syndrome thalassémique, c'est-à-dire d'un déficit de synthèse de l'une des chaînes de globine. Il s'agit, là aussi, d'une substitution de surface, mais la mutation faux sens du codon 26, dans le premier exon du gène  $\beta$ -globine, crée aussi un site alternatif d'épissage, partiellement utilisé, qui dévie une partie de l'ARN messager vers une maturation anormale, aux dépens de la production d'ARN<sub>m</sub> normal. La substitution d'acide amine, en elle-même, n'affecte pas la fonction de l'Hb, mais la diminution de l'ARN<sub>m</sub> normal conduit à un défaut de production. L'hémoglobinose E se présente donc comme une thalassémie discrète, responsable à l'état homozygote d'une anémie modérée en règle générale bien tolérée. Il existe trois types d'hémoglobinose E :

- A. L'hémoglobinopathie E hétérozygote (AE) :** se caractérise par une microcytose sans anémie ou un pseudo polyglobulie microcytaire.
- B. L'hémoglobinopathie E homozygote (EE) :** entraîne une microcytose avec anémie absente ou modérée.
- C. La double hétérozygotie HbE/ $\beta$ Thal :** à un aspect de thalassémie majeure (Voet et Voet, 2005).

### II-3-1-3- l'hémoglobinose C

L'Hémoglobinose C est une maladie génétique due à la synthèse d'une hémoglobine anormale, l'hémoglobine C (HbC) remplace l'hémoglobine A (HbA) normale. Les hématies contenant l'hémoglobine C sont des cellules partiellement déshydratées, de petite taille, ayant une charge d'hémoglobine normale. L'augmentation de la concentration en hémoglobine explique la présence des cristaux observés à l'intérieur des hématies. Il existe une perturbation des échanges ioniques transmembranaires. Cette forte concentration hémoglobinique rend compte de la sévérité de l'hétérozygotie composite « hémoglobine S / hémoglobine C » (Voet et Voet, 2005).

La mutation affecte comme celle de l'HbS, la 6<sup>ème</sup> acide amine de la chaîne  $\beta$ -globine (Glu→Lys) mais ne provoque pas la formation de polymères. En revanche, des cristaux intraérythrocytaires sont mis en évidence et qui sont responsables d'une augmentation de la densité du globule rouge, de sa déshydratation et de sa liaison à la membrane. L'ensemble de ces phénomènes est sans doute suffisant pour expliquer une présentation phénotypique extrêmement modérée chez les sujets homozygotes CC (Voet et Voet, 2005).

### II-3-1-4- L'hémoglobinose instable

Les hémoglobinoses instables constituent un groupe particulier d'hémoglobines anormales responsables d'anémies hémolytiques caractérisées par la présence de corps de Heinz. La première description d'anémie hémolytique par hémoglobine instable a été effectuée en Grande-Bretagne chez un enfant ayant une cyanose associée à une splénomégalie. Il s'agissait de l'hémoglobine Köln dont la chaîne  $\beta$  présente une méthionine en position 98 à la place d'une valine. Actuellement une centaine de ce type de mutants de l'hémoglobine est connue. Certaines hémoglobines instables, détruites précocement dans l'érythrocyte, correspondent pratiquement à des thalassémies. Il s'agit, à la différence des précédentes, d'anomalies rares, beaucoup de cas rapportés résultant d'une mutation récente (Voet et Voet, 2005).

Les acides aminés internes qui interviennent dans les contacts avec l'hème, dans la stabilisation des hélices, dans les contacts entre les sous-unités sont invariables dans les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la plupart des mammifères. Cette invariance permet de concevoir l'importance de leur rôle dans la structure et la fonction normale de l'hémoglobine. Les variantes ont été trouvées à l'état hétérozygote, car à l'état homozygote, ces anomalies sont létales. Le remplacement d'un résidu de leucine par un résidu de proline ; dans trois de ces hémoglobines : Hb Santa Ana (ou

Lille) ( $\beta 88$  Leu  $\rightarrow$  Pro), Hb Sabine ( $\beta 91$  Leu  $\rightarrow$  Pro), dans l'Hb Genova ( $\beta 28$  leu  $\rightarrow$  Pro), la leucine n'intervient pas dans le contact avec l'hème, mais on peut admettre que la proline va provoquer une modification de l'hélicité de la chaîne  $\beta$  ; à signaler aussi l'Hb Dakar-Saki, où il y'a une mutation  $\beta 11$  (A11) Leu  $\rightarrow$  Pro. Le remplacement d'un résidu apolaire par un résidu polaire, exemple : Hb Zurich :  $\beta 63$  His  $\rightarrow$  Gln ; Hb Hammersmith :  $\beta 42$  Phe  $\rightarrow$  Ser. La gravité de Hb Hammersmith provient du remplacement de la phénylalanine par un résidu de sérine : les études cristallographiques ont montré que le résidu de phénylalanine joue un rôle essentiel dans le maintien de la configuration oxygénée. L'Hb Hammersmith a une affinité pour l'oxygène diminuée et s'oxyde anormalement en hémichrome, ce qui s'explique par la formation d'une liaison directe, sans l'intermédiaire d'une molécule d'eau, entre le fer et l'histidine distale (His  $\beta 63$ ). Les modifications au niveau de la poche de l'hème : exemple : Hb Saint- Etienne :  $\beta 92$  His  $\rightarrow$  Gln ; la perte de l'histidine proximale ne permet plus la fixation de l'hème. Des délétions : exemple : Hb Lyon l'absence de deux acides aminés (Lys 17, Val 18) modifie la structure tertiaire des chaînes  $\beta$  (Boulanger et *al.*, 1977). Dans l'Hb Philly où la Try C<sub>1</sub>(35)  $\beta$ , qui participe au réseau de liaisons hydrogène à l'interface  $\alpha_1$ - $\beta_1$ , est remplacée par une Phe (Gulbis et *al.*, 2004).

### II-3-1-5-L'hémoglobine M

Les méthémoglobines sont appelées Hb M et les personnes qui en sont porteuses souffrent de méthémoglobinémie. Elles ont également une peau bleuâtre (la cyanose), due à la présence de désoxy Hb dans le sang artériel (Voet et Voet, 2005).

Toutes les méthémoglobines connues résultent de substitution qui donne à l'atome de fer un atome d'oxygène anionique comme ligand. Dans Hb Boston, le remplacement, par une Tyr, de l'His (58)  $\alpha$  (l'His distale, qui protège l'hème contre l'oxydation ; section 10-2G) permet la formation d'un complexe de coordination -5 Fe<sup>+3</sup> avec l'ion phénolate du mutant Tyr E7 déplaçant ainsi le noyau imidazole de His (87) comme ligand apicale. Dans Hb Milwaukee, le groupement  $\gamma$ - carboxylate du Glu qui remplace la Val (167)  $\beta$  forme une paire d'ions avec un complexe de coordinence -5 Fe<sup>+3</sup>. Les ions phénolate et glutamate de ces méthémoglobines stabilisent fortement l'état d'oxydation Fe<sup>+3</sup>. Les méthémoglobines ont des constantes de Hill de l'ordre de 1,2, ce qui indique une coopérativité diminuée par rapport à l'HbA même si l'HbM, qui ne peut lier que deux molécules d'oxygène, peut avoir une constante de Hill maximum de 2 (les chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  non modifiées restent fonctionnelles). Étrangement, les hétérozygotes ayant de l'HbM, avec en moyenne une sous-unité  $\alpha$  ou  $\beta$  non fonctionnelle par molécule d'Hb, n'ont pas de symptômes. De toute évidence, la quantité d'O<sub>2</sub> libéré dans leurs capillaires est dans les normes. Cependant, il n'y a pas d'homozygotes Hb M ; cet état est certainement létal (Couprie, 2000).

### II-3-1-6-L'hémoglobine à affinité modifiée pour l'oxygène

Certaines variantes de l'hémoglobine ont des propriétés anormales de fixation de l'oxygène (affinité pour l'O<sub>2</sub>). Les hémoglobines à affinité augmentée, plus fréquentes, se traduisent par une polyglobulie familiale de sévérité parallèle au degré de l'augmentation de l'affinité. Hb Chesapeake ( $\alpha 92$  Arg  $\rightarrow$  Leu) avec augmentation de l'affinité (Boulanger et *al.*, 1977). L'Hb Capetonn ( $\alpha 92$  Arg  $\rightarrow$  Gln) est due à une mutation au même endroit. L'Hb Tak ( $\beta 147$ ) est une hémoglobine anormale dont la chaîne bêta comporte 11 acides aminés supplémentaires. Elle est totalement fixée dans la forme R et montre de ce fait une forte affinité pour l'oxygène avec érythrocytose par modification de l'extrémité C- terminale, qui joue un rôle important dans les modifications de conformation de l'hémoglobine en stabilisant la forme T. Un



autre exemple est l'Hb Saverne, qui montre également un allongement de la chaîne bêta à l'extrémité C- terminale. Hb porto Alegre ( $\beta$  9 Ser→Cys), la mutation produit une tendance à l'agrégation de la forme oxygénée de la molécule, tout en augmentant l'affinité pour l'oxygène. L'hémoglobine San Diego ( $\beta$  109 Val→Met) en est le prototype et induit une érythrocytose. Trois mutations se situent sur la lysine 82 de la chaîne  $\beta$  et induisent la perte de l'un des sites de fixation du 2,3 DPG, ce que favorise la forme R. L'Hb Rahere (Lys→Thr), l'Hb Helsinki (Lys→Met), l'Hb providence (Lys → Asn, Asp), toutes ont une affinité élevée et les porteurs montrent une polycythémie modérée. L'Hb Old Dominion ( $\beta$  143 His → Tyr), induit une augmentation d'affinité modérée.

Les hémoglobines à affinité diminuée se caractérisent par une anémie bien tolérée et une cyanose. Hb Kansas  $\beta$  102 Asn→Thr avec diminution de l'affinité (Gulbis *et al.*, 2004).

### II-3-1-7- L'hémoglobinose S / $\beta$ thalassémies

Se traduisent selon les cas par des accidents de thrombose ou une anémie isolée. Elles doivent être évoquées devant une microcytose chez un drépanocytaire ; la forme usuelle  $\beta^+$ /S présente, contrairement à la drépanocytose hétérozygote, plus d'HbS et de l'HbF et doit être distinguée de la drépanocytose homozygote par l'enquête familiale (Zittoun *et al.*, 1998).

### II-3-2- Les thalassémies

Les thalassémies, qui correspondent à des déficits de synthèse des différents types de chaînes : théoriquement, cinq types peuvent être rencontrés, correspondant aux cinq chaînes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), mais la  $\gamma$ -thalassémie n'a pas été observée (Boulangier *et al.*, 1977). Les thalassémies sont nommées en fonction de la chaîne de globine affectée : l' $\alpha$ -thalassémie met en jeu la chaîne  $\alpha$ , tandis que la  $\beta$ -thalassémie met en jeu la chaîne  $\beta$ . Une personne normale compte un total de quatre gènes de globine  $\alpha$  apparaissant sur le bras court du chromosome 16 (deux gènes par chromosome, représentés comme suit :  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) et deux gènes de globine  $\beta$  apparaissant sur le bras court du chromosome 11 (un par chromosome, ou  $\beta/\beta$ ). Les gènes  $\beta$ -mimétiques (tels que  $\gamma$  et  $\delta$ ) se situent tout près sur le chromosome 11 (Langlois *et al.*, 2008). Les groupes des  $\alpha$ - et  $\beta$ -thalassémies est le plus important. Les thalassémies qui résultent d'un déficit de synthèse s'accompagnent d'une non-compensation de synthèse : c'est-à-dire que la charge hémoglobinique (quantité d'hémoglobine par globule rouge) est abaissée et inférieure à 29 picogrammes (Boulangier *et al.*, 1977).

#### II-3-2-1- La Génétique des thalassémies

Les travaux de ces dernières années ont montré l'extrême hétérogénéité génétique des thalassémies au niveau moléculaire. Les lésions de l'ADN vont de mutations ponctuelles à de larges délétions. La connaissance de ces mutations éclaire le fonctionnement de gènes de globine. Elle montre que les homozygotes sont en fait très souvent, au niveau de l'ADN, des doubles hétérozygotes (Lévy *et al.*, 2008).

#### II-3-2-2- Les différents types de thalassémie

##### II-3-2-2-1- Les $\beta$ - thalassémies

En 1925, Cooley et Lee décrivent à Détroit une anémie érythroblastique sévère avec hépatosplénomégalie chez les enfants descendants d'immigrants italiens. A la même époque, Rietti décrit en Italie un ictère hémolytique avec augmentation de la résistance globulaire. Greppi, puis Micheli, confirment un peu plus tard la réalité de ce syndrome. Par la suite,

la parenté des deux affections fut établie. Mais ce n'est qu'en 1948, que Vecchio a décelé la présence d'une quantité anormale d'hémoglobine fœtale (Boulanger et *al.*, 1977). Dans les quelles un ou deux gènes de la globine  $\beta$  sont déficitaires (Zandecki, 2006).

### A- La répartition géographique

Les plus fortes densités de  $\beta$ -thalassémies sont décrites sur le pourtour méditerranéen : Italie, Sardaigne, Sicile, Grèce (la fréquence du trait est de l'ordre de 8 % de la population), Afrique du Nord, Proche et Moyen-Orient sauf le Japon. En Afrique intertropicale, la fréquence varie de 1 à 5% selon les régions. En France, 36,5 % des sujets originaires de pays à haut risque pour les  $\beta$ -thalassémies résident dans la région parisienne et 63,5 % en province, cette répartition géographique justifie le nom de thalassémies (Badens et *al.*, 2000).

### B- La physiopathologie des $\beta$ -thalassémies

La  $\beta$ -thalassémie est provoquée par des mutations affectant les gènes  $\beta$ -globines sur le chromosome 11. Ces mutations peuvent se traduire en une chute ( $\beta^+$ ) ou en une absence ( $\beta^0$ ) de production de  $\beta$ -globine. En présence d'une  $\beta$ -thalassémie, les chaînes  $\beta$  de la globine sont structurellement normales, ce n'est que leur quantité qui est réduite. Puisque les personnes normales comptent deux copies du gène  $\beta$ , celles qui comptent un gène normal et un gène affecté (génotypiquement représentées comme étant  $\beta/\beta^+$  ou  $\beta/\beta^0$ , selon le type de la mutation du gène  $\beta$ ) sont souvent asymptomatiques (Langlois et *al.*, 2008).

### C- La classification des lésions moléculaires des $\beta$ -thalassémies

Les lésions moléculaires à l'origine des  $\beta$ -thalassémies sont nombreuses et la liste ne peut en être exhaustive.

- Les délétions étendues sont rares (contrairement au cas des  $\alpha$ -thalassémies) ;
- Les mutations non-sens aboutissent à l'apparition d'un codon de terminaison prématurée (par exemple : apparition d'un codon-stop  $\beta^0$  39) ;
- Les mutations décalantes du cadre de lecture par insertion ou délétion d'une ou de plusieurs bases (mutations « frame-shift ») ;
- Les mutations affectant l'épissage normal du transcrit primaire en ARN messager : anomalie de la charnière exon-intron, anomalies de séquences consensus, anomalies à l'intérieur d'un intron ;
- Les mutations dans le promoteur du gène ;
- Les mutations dans le site de polyadénylation (extrémité 3' de l'ARN messager) ;
- Les mutations du site CAP (extrémité 5' de l'ARN messager) ;
- Les mutations du codon d'initiation ;
- Des hémoglobines hyper-instables peuvent entraîner une  $\beta$ -thalassémie comme l'hémoglobine Cagliari  $\beta$  60 [E4] Val - Glu, par exemple.
- Certaines hémoglobines anormales comme l'hémoglobine E ( $\beta$  26 [B8] Glu - Lys) ou l'hémoglobine Knossos ( $\beta$  27 [B9] Ala - Ser) s'accompagnent d'un syndrome thalassémique (Couprie, 2000).

### D- La classification clinique des $\beta$ -thalassémies

#### a- Les $\beta$ -thalassémies homozygote ou maladie de Cooley (majeure)

À la naissance le taux d'hémoglobine est normal : le nouveau-né a principalement de l'Hb. Au cours des premiers mois, le déficit de synthèse des chaînes  $\beta$  s'accompagne d'un excès relatif de chaînes  $\alpha$  qui précipite dans les érythroblastes entraînant leur destruction et donc une érythropoïèse inefficace responsable avec l'hyperhémolyse de l'anémie profonde constatée. Il y a également une splénomégalie et une hyperplasie de la lignée érythroblastiques responsable de



déformation des os du crâne chez l'enfant. Biologiquement on retrouve une anémie profonde, une microcytose, une hypochromie et une érythroblastose souvent importante. L'étude de l'hémoglobine montre une absence totale ( $\beta^0$ -thalassémie homozygote) ou un taux très faible d'HbA ( $\beta^+$ -thalassémie homozygote), une HbF majoritaire et une HbA<sub>2</sub> normale ou augmentée.

Cliniquement on distingue 2 types de  $\beta$ -thalassémie homozygote:

- L'anémie de Cooley ou thalassémie majeure : le taux d'hémoglobine est inférieur à 8 g/l ;
- La thalassémie intermédiaire c'est une forme atténuée : le taux d'hémoglobine est supérieur à 8 g/l. Cette sévérité moindre est due soit à une faible persistance d'Hb A, soit à la présence d'une  $\alpha$ -thalassémie associée (Lelong et al., 2003).

### b- Les $\beta$ -thalassémies hétérozygote

La mutation responsable d'un défaut de synthèse de chaîne  $\beta$  porte sur un seul gène  $\beta$  (Zandecki, 2006). Les sujets porteurs sont asymptomatiques, exceptionnellement une splénomégalie peut être constatée. Le taux d'hémoglobine est normal ou peu diminué (100-130 g/l), la réticulocytose est absente ou modérée, le frottis montre une hypochromie, une anisocytose, une poikilocytose. Les signes biologiques sont l'augmentation du nombre de globules rouges et la microcytose (Barro, 2005).

Toutes les complications des  $\beta$ -thalassémies intermédiaires peuvent être observées mais leur fréquence et leur gravité sont infiniment moindres : splénomégalie, ulcères de jambes, lithiase vésiculaire (Couprie, 2000).

Tableau 02 : Syndromes  $\beta$ -thalassémiques (Zandecki, 2006).

Variant génétique	Etat hétérozygote	Etat homozygote
$B^0$ -thalassémie.	Hb A <sub>2</sub> élevée. Hb F inconstante.	HbF et HbA <sub>2</sub> . Présence de chaînes $\alpha$ libres. Maladie grave.
$B^+$ -thalassémie.	Hb A <sub>2</sub> élevée. Hb F inconstante.	HbF élevée (20 à 80%). HbA <sub>2</sub> variable. Présence de chaînes $\alpha$ libres. Maladie sévère.
$(\beta\delta)^0$ -thalassémie.	Hb A <sub>2</sub> élevée. Hb F augmenté (5 à 15%).	HbF seulement. Maladie sévère ou modérée.
Variante Lepore.	Hb A <sub>2</sub> bas. Hb F augmenté. Hb Lepore : 15%.	HbF et Hb lepore (30%). Maladie sévère.
Formes associées : S/thal <sup>0</sup> . S/thal <sup>+</sup> .	HbS, HbA <sub>2</sub> augmentée, HbF. HbS en quantité supérieure à HbA, HbA <sub>2</sub> augmentée, HbF fréquente.	/

### c- Les $\beta$ -thalassémies silencieuse

Il s'agit d'une forme inapparente de  $\beta$ -thalassémie, même sur le plan hématologique et l'hémoglobine A<sub>2</sub> peut être normale. Cette forme est déduite de l'étude familiale. Sur le plan moléculaire, il s'agit de certaines mutations du promoteur diminuant faiblement la transcription du gène  $\beta$  (Couprie, 2000).

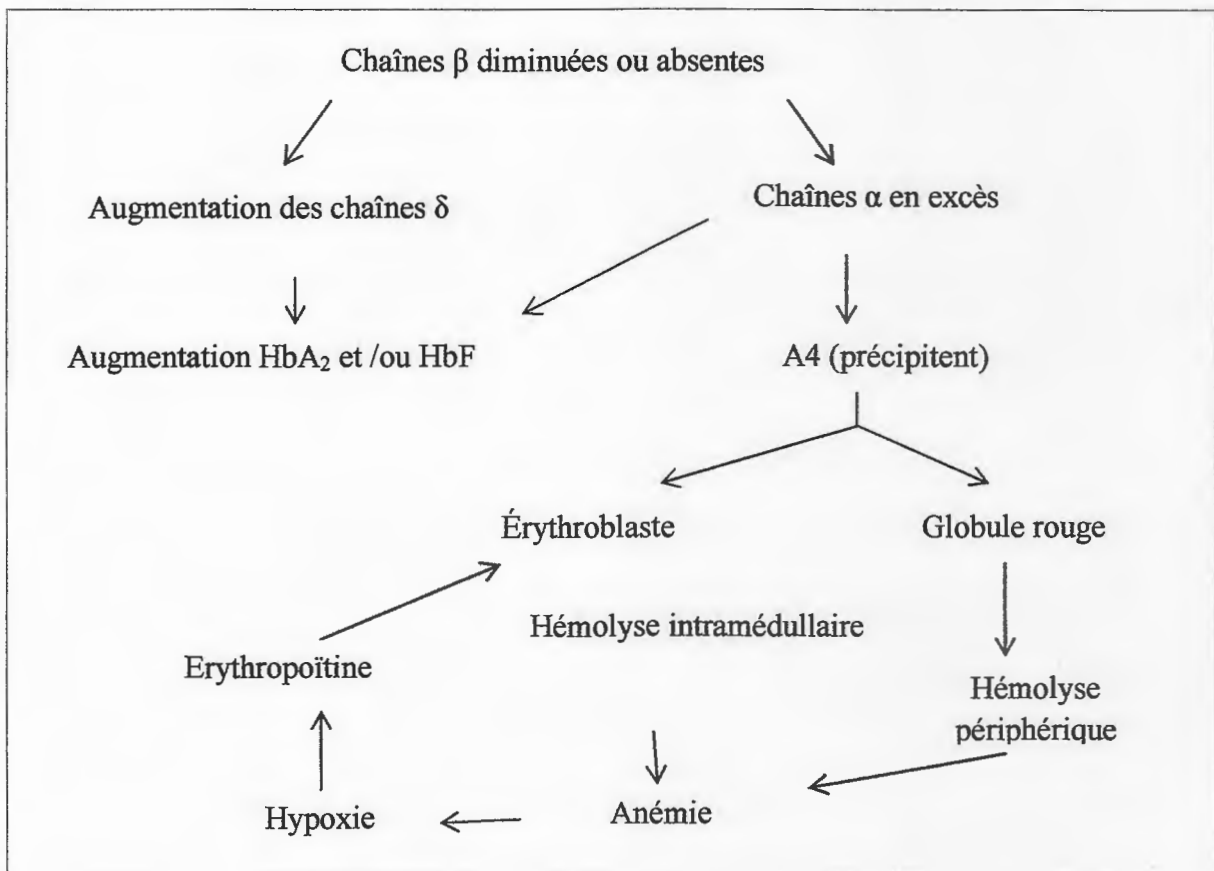


Figure 13 : Physiopathologie de l’anémie dans les β-thalassémies homozygotes (Lévy et al., 2008)

**II-3-2-2-2- Les α-thalassémies**

L’α-thalassémie survient lorsqu’une mutation génétique mène à une insuffisance de la synthèse d’un ou de plusieurs des quatre gènes α-globines (tableau 3).

Tableau 03 : Syndrome α-Thalassémiques (deux gènes pour la chaîneα) (Bernard et al, 1998).

Affection	génotype	Anomalies néonatales	Anomalies de l’adulte
Hydrops fœtale	α <sub>1</sub> Thal/ α <sub>1</sub> Thal.	Mort rapide après 28-36 sem. De vie intra utérine Hb Bart’s ; (γ <sub>4</sub> ) (80à90%) ; un peu d’Hb portland.	/
Hémoglobinosé H	α <sub>1</sub> Thal/ α <sub>2</sub> Thal	Anémie modérée ; Hb Bart’s : 10-25%	Anémie modérée ; Hb H /25 à. Globules rouges avec granulation colorables par le bleu de crésyl.
Thalassémie mineure	α <sub>1</sub> Thal/ α	Pas d’anémie ; Hb Bart’s : 5-10%	Pas d’anémie ; quelque granulations colorables
Porteur asymptomatique	α <sub>2</sub> thal/ α.	Pas d’anémie ; Hb Bart’s : 1-2%	Pas décelable

### A- La répartition géographique

Les  $\alpha$ -thalassémies ont une fréquence encore plus importante que les  $\beta$ -thalassémies en Afrique, en Asie et autour de la Méditerranée. En général, elles n'ont de conséquence clinique que dans les formes où trois ou quatre gènes  $\alpha$  sont anormaux ou absents. La délétion des quatre gènes  $\alpha$  concerne particulièrement les populations du Sud-est asiatique (Bernard *et al.*, 1998).

### B- La physiopathologie des $\alpha$ -thalassémies

Les symptomatologies des thalassémies résultent de l'association de plusieurs phénomènes :

Un défaut de synthèse de l'hémoglobine, c'est le seul qui a été observé chez l'hétérozygote : il explique la microcytose quasi constante dans les thalassémies quelle que soit la forme (homozygote, hétérozygote ou double hétérozygote avec un mutant sur l'autre chaîne) (Bernard *et al.*, 1998).

Un excès de la chaîne homologue (chaîne  $\alpha$  dans les  $\beta$  et  $\delta$ - $\beta$  thalassémies, chaîne  $\beta$  ou  $\gamma$  dans les  $\alpha$ -thalassémies). Cet excès de chaîne libre qui précipite dans l'érythroblaste ou le globule n'est pathogénique chez l'homozygote et l'HbH. Il entraîne une hémolyse à la fois intramédullaire et périphérique (Bernard *et al.*, 1998).

Dans les  $\beta$ -thalassémies pour tenter de compenser le défaut de synthèse de chaîne  $\beta$  il ya augmentation de la synthèse des chaînes non  $\alpha$  ( $\delta$  ou  $\gamma$ ). Cette augmentation compensatrice n'atteint pas cependant un taux suffisant pour empêcher l'excès de chaîne  $\alpha$  d'apparaître. Dans les  $\beta$ -thalassémies il ya augmentation des chaînes  $\delta$  ou  $\gamma$ . Dans les  $\delta$ - $\beta$ -thalassémies seuls la chaîne  $\gamma$  peut augmenter. Dans les  $\alpha$ -thalassémies en l'absence de gènes voisins permettant une compensation dans les formes majeurs un tel phénomène ne peut exister (Bernard *et al.*, 1998).

### C- La classification des lésions moléculaires des $\alpha$ -thalassémies

Les  $\alpha$ -thalassémies résultent d'un défaut d'expressions d'un ou des plusieurs des gènes codant pour les chaînes  $\alpha$  de globine. Le mécanisme moléculaire le plus souvent incriminé est une délétion de globine  $\alpha$ . Des mutations ponctuelles affectant la transcription ou la traduction de la chaîne  $\alpha$  ont également été décrites. Enfin, certaines anomalies de structure des chaînes  $\alpha$  peuvent diminuer considérablement leur taux d'expression et réaliser également des symptômes thalassémiques (Rosa *et al.*, 1993).

#### a- Les $\alpha$ -thalassémies délétionnelles

La structure de complexe des gènes  $\alpha$  sur le chromosome 16 explique la fréquence des délétions. Il existe en effet, dans les régions situées entre les gènes  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_1$ , des zones d'homologue appelées X, Y et Z. Ces zones ont à leur proximité de courtes séquences répétitive, reconnus comme points chauds de recombinaisons géniques. De telles séquences favorisent des échanges de matériel génétique entre chromosomes lors de la méiose. Si elles aident à la conservation de l'information génétique en corrigeant d'éventuelles erreurs. Elle facilite également des «crossing-over» non homologues, ce qui conduit à la perte d'un fragment contenant un ou deux gènes sur un chromosome et à son intégration sur l'autre, le corollaire de ce mécanisme est la possibilité de génomes comportant des chromosomes 16 avec trois gènes  $\alpha$  (Tableau 4). Ceci a effectivement été retrouvé en rare daigne où de tels individus sont rencontrés avec une fréquence de 0.5%. Les délétions observées dans les  $\alpha$ -thalassémies sont plus ou moins larges. La délétion concerne le plus souvent le gène  $\alpha_2$ . Lorsque chez un même patient, deux gènes sont absents, il peut s'agir soit de la délétion de gène de  $\alpha_2$  sur chacun des chromosomes, soit de la délétion des gènes  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  sur le même chromosome. Selon que la délétion touche un seul gène (hétérozygote), il s'agit d'une  $\alpha^+$  ou d'une  $\alpha^0$ -thalassémie (Rosa *et al.*, 1993).

Tableau 04 : Classification des  $\alpha$ -thalassémie délétionnelles (Rosa et al., 1993).

phénotype	Nombre de gène $\alpha$ fonctionnels	Génotype
$\alpha^+$ -thalassémie	3	$\alpha\alpha / -\alpha$
$\alpha^+$ -thalassémie homozygote	2	$-\alpha / -\alpha$
$\alpha^0$ -thalassémie	2	$\alpha\alpha / --$
Hémoglobinoses H	1	$-\alpha / --$
Hydrops fœtales	0	$-- / --$

### b- Les $\alpha$ -thalassémies non délétionnelles

Une mutation d'une zone de régulation est soupçonnée dans le cas d'hémoglobine H (dont la présence suppose le non fonctionnement de trois gènes  $\alpha$ ) alors que l'électrophorèse des fragments de restriction ne révèle que la délétion de deux gènes, l'étude des séquences nucléotidique des gènes  $\alpha$  de ces malades a permis d'identifier plus d'une vingtaine de mutations non délétionnelles différentes responsable d'un défaut de synthèse des chaînes  $\alpha$ . La génération d'une méthode d'amplification on élective des fragments d'ADN (PCR) contribuera certainement à l'identification d'un nombre croissant de lésions moléculaires responsable de tels désordres. Des chaînes  $\alpha$  structurellement anormales et particulièrement instable peuvent se comporter comme des syndromes thalassémiques. Ainsi, l'Hb Quong S Ze ( $\alpha_{125}$  (His) leu $\rightarrow$  pro) n'est décelable qu'à l'état de traces et uniquement chez le sujet splénectomisé. Enfin, signalons le cas des mutations intéressant le codon de terminaison du gène  $\alpha_2$ . Elles sont responsables d'une stabilité d'une chaîne allongée ; l'Hb «constante Spring» est l'exemple le plus fréquent (Rosa et al., 1993).

### c- Les $\alpha$ -thalassémies acquises

Il a été décrit quelques cas d' $\alpha$ -thalassémie acquise : l'hémoglobinoses H associée à un syndrome de prolifération leucémique, le plus souvent chez des sujets âgés de sexe masculin. Le mécanisme moléculaire responsable de l'absence de synthèse des chaînes  $\alpha$  dans ces érythrocytes anormaux est encore totalement inconnu (Coupré, 2000).

## D- La classification clinique des $\alpha$ -thalassémies

Les  $\alpha$ -thalassémies s'expriment selon quatre formes cliniques, en fonction du nombre de gènes défectueux ou absents. En pratique, cette classification doit être nuancée par la différence d'expression des gènes  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  (Haward et Hamilton, 2004).

### a- L'anasarque foeto-placentaire avec présence d'hémoglobine Bart's ( $--/--$ )

Dans ce cas, la délétion des quatre gènes conduit à une absence total de synthèse de chaîne  $\alpha$  dans la mesure où la chaîne  $\alpha$  est nécessaire à la constitution de l'HbF, ainsi qu'à l'HbA, cette anomalie est responsable de la mort in utero (anasarque foeto-placentaire) (Haward et Hamilton, 2004).

### b- L'hémoglobinoses H ou maladie Hb H ( $-\alpha/--$ )

Cette maladie provoquée par la délétion de trois des quatre gènes codant pour l' $\alpha$ -globine se rencontre le plus fréquemment en Asie du Sud-est. Les caractéristique cliniques sont variables, mais on observe souvent une anémie hémolytique chronique modérée (Hb : 7 à 11 g /dl), avec une splénomégalie et parfois une hépatomégalie. Le frottis sanguin montre des hématies microcytaires et hypochromes. Ainsi, qu'une polychromatophile et des cellules cible, la

molécule d'hémoglobine H est formée de tétramères instable de chaîne  $\beta$  non appariées ( $\beta_4$ ) (Howard et Hamilton, 2004).

**c- L' $\alpha$ -thalassémie mineure ou  $\alpha$ -thalassémie -1**

Il reste 2 gènes  $\alpha$  fonctionnels. Le tableau clinique est celui d'une pseudopolyglobulie microcytaire avec anémie discrète ou absente (Zittoun et *al.*, 1998).

**d- L' $\alpha$ -thalassémie -2 ou  $\alpha$ -thalassémie silencieuse**

Quand il reste trois gènes normaux, l' $\alpha$ -thalassémie est pratiquement asymptomatique en dehors de la présence d'hémoglobine Bart (tétramères  $\gamma_4$ ) présente à un taux de 1 à 2 %, à la naissance. Elle peut cependant être suspectée quand elle est associée à une hémoglobine anormale, par exemple : hémoglobine S, C, E ou en cas de  $\beta$ -thalassémie de sévérité intermédiaire chez un homozygote  $\beta^0$ -thalassémique (Couprie, 2000).

**e- L'hémoglobine lepre**

Résulte d'un crossing over entre les gènes  $\beta$  et  $\gamma$  ; elle réalise un tableau de thalassémies avec en outre présence de l'hémoglobine lepre à chaîne hybride  $\gamma\beta$  (Lévy et *al.*, 2008).

**f- L' $\delta\beta$  –Thalassémie homozygote**

Elle réalise un tableau de thalassémies intermédiaire c'est-à-dire une hémolyse chronique microcytaire avec splénomégalie moins sévère que la maladie de Cooley. L'hémoglobine est autour de 8-9g en l'absence de transfusion avec une espérance de vie plus prolongée (Lévy et *al.*, 2008).

**g- La Bêta et bêta-delta- thalassémies mineures**

Ce sont les formes de l'hétérozygote (Lévy et *al.*, 2008).



***Chapitre III :***

***Le diagnostic des  
hémoglobinopathies***

Les circonstances d'étude des hémoglobines au laboratoire sont multiples. Elles sont en général recherchées consécutivement à la présence de signes cliniques d'appel : anémie, ictère, hépatomégalie. Elles sont le plus souvent mises en évidence dans des populations à risque. La plus part du temps, un examen hématologique de routine (numération globulaire, VGM, TCMH) révèle une anémie normocytaire ou microcytaire hypochrome avec anomalies de tailles, de formes ou de coloration des hématies, ou quelques fois une polyglobulie (pseudo polyglobulie microcytaire), l'ensemble de ces éléments faisant évoquer une hémoglobinopathie. Ces pathologies peuvent également être détectées lors du dosage de l'hémoglobine, associée à une technique séparative des hémoglobines. Il est parfois nécessaire de réaliser des examens complémentaires (électrophorèse en milieu acide, dosage des différentes fractions) afin de préciser la nature de l'anomalie (Vanbourdolle, 2007).

Un prélèvement de sang est en général effectué dans le but de réaliser des examens biologiques complémentaires, pour le diagnostic. Un tube de sang total recueilli sur EDTA suffit (Vanbourdolle, 2007).

### **III-1- Le diagnostic biologique classique**

#### **III-1-1- L'hémogramme ou FNS**

Elle est le premier examen biologique utilisé pour dépister, explorer et suivre la plupart des hémopathies (Lainey et Boirie, 2009).

Les techniques manuelles, après dilution, nécessitent un comptage au microscope des éléments. Les techniques actuelles de numération sont réalisées par des compteurs électroniques de particules. Ces appareils sont capables de mesurer des variations de résistivité ou de diffraction provoqués par le passage des éléments devant un micro-orifice. Une analyse tridimensionnelle en fonction de la taille des cellules et de l'activité peroxydase peut être réalisée par l'association de la diffraction laser et de la cytochimie de flux (Kamoun et Fréjaville, 2002). L'hémogramme doit comprendre les valeurs de l'hémoglobine, l'hématocrite, la numération des érythrocytes, des principales constantes érythrocytaires : volume globulaire moyen (VGM), concentration corpusculaire moyenne en Hémoglobine (CCMH) et teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), la numération des leucocytes avec établissement d'une formule détaillant le nombre de polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles, de monocytes et de lymphocytes (et d'éventuelles autres cellules circulantes) et la numération des plaquettes (Imbert, 2008).

#### **III-1-2- Les techniques électrophorétiques et chromatographiques**

Les techniques de séparation électrophorétique et chromatographiques appliquées à un hémolysat permettent, dans des conditions physico-chimiques bien déterminées, de séparer les différentes hémoglobines.

##### **III-1-2-1- l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin**

C'est la technique standard la plus simple à mettre en œuvre. Elle sépare les différentes hémoglobines en fonction de leur charge et de la position de l'acide aminé muté dans la molécule, les hémoglobines qui ont un gain de charge positive migrent plus lentement vers l'anode. Elle permet une bonne séparation des différentes fractions hémoglobiniques normales : A, F, A<sub>2</sub> et le dépistage des syndromes thalassémiques. Cependant il faut doser l'hémoglobine A<sub>2</sub> pour confirmer le diagnostic de  $\beta$ -thalassémie et utiliser un autre système de séparation pour identifier les hémoglobines anormales (Vinatier, 2006).

### III-1-2-2- l'électrophorèse sur agar à pH acide

Cette technique complète l'électrophorèse à pH alcalin. La migration d'une hémoglobine anormale en agar dépend d'abord de la localisation de la mutation et secondairement du changement de charge ; cette migration résulte de l'électroendosmose, de la liaison à l'agaropectine et de l'effet de l'ion citrate.

En effet, elle permet de séparer les variantes ayant la même mobilité que les hémoglobines A, S ou C sur acétate de cellulose. Elle permet une très bonne séparation des hémoglobines A et F, ce qui n'est pas le cas dans l'électrophorèse à pH alcalin, peut permettre de caractériser l'hémoglobine S, l'hémoglobine C est la plus lente de toutes les hémoglobines anormales et l'hémoglobine E se distingue des précédentes car elle migre comme l'hémoglobine A, contrairement aux deux autres.

Cependant la mise en évidence de mutants de même mobilité que l'hémoglobine A n'est pas possible par cette seule technique. De plus, les anomalies qualitatives observées sur les tracés doivent être précisées par dosage. Cette technique est extrêmement sensible aux conditions expérimentales et leur reproductibilité est difficile (figure 14) (Couprie, 2000).

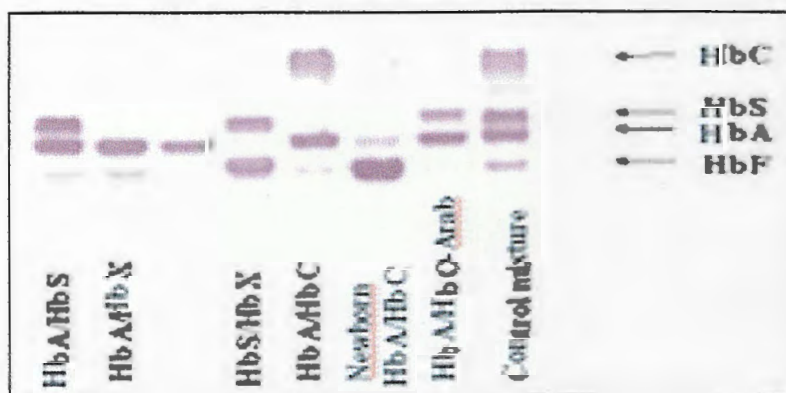


Figure 14: Electrophorèse sur agar à pH acide des hémoglobines (Vinatier, 2006).

### III-1-2-3-L'isoélectrofocalisation

L'isoélectrofocalisation est une technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de pH, sous voltage élevé. Les hémoglobines sont séparées grâce à leur point isoélectrique. La visualisation définitive des fractions hémoglobiniques est réalisée par une brève fixation par l'acide trichloracétique (North et *al.*, 1995).

Le pouvoir de résolution de cette technique est proche de celui des meilleures techniques chromatographiques. Elle permet d'identifier les hémoglobines anormales chez l'adulte par comparaison de la position isoélectrique du mutant inconnu avec celle d'un mutant de référence. Elle permet de détecter les hémoglobines anormales chez le nouveau-né alors que l'hémoglobine F est le composant hémoglobinique majeur dans les premiers mois de la vie. Permet aussi de caractériser l'hémoglobine S. C'est la technique de référence pour le diagnostic néonatal des hémoglobinopathies ; elle peut alors être réalisée à partir de quelques gouttes de sang recueillies sur un papier buvard. Elle est individualise précisément l'hémoglobine C. l'hémoglobine E se distingue très discrètement des hémoglobines A2 et C (figure 15) (Couprie, 2000).



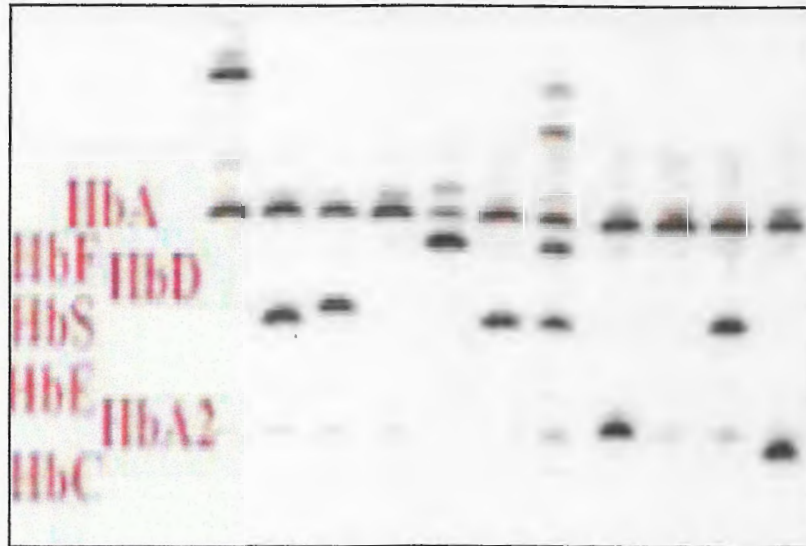


Figure 15 : Focalisation isoélectrique des hémoglobines (Vinatier, 2006).

#### III-1-2-4- L'électrophorèse des chaînes de globine

Cette électrophorèse est réalisée en gel de polyacrylamide en milieu acide dissociant, c'est-à-dire en présence d'urée 8M et d'un détergent le Triton-X100. Cette technique met en évidence toute substitution d'acides aminés impliquant une différence d'hydrophobicité de la chaîne latérale de l'acide aminé concerné, même en l'absence de différence de charge. Elle permet de séparer les deux chaînes  $\gamma$  qui ne diffèrent entre elles que par un résidu méthyl ( $\gamma$ 136 Ala ou Gly). Cette technique permet la séparation de la chaîne  $\beta$  de globine normale et de la chaîne  $\beta$  mutée de l'hémoglobine instable (Couprie, 2000).

#### III-1-2-5- La chromatographie échangeuse d'ions

Des microcolonnes échangeuses d'anions, prêtes à l'emploi, permettent de mesurer rapidement les taux d'HbA<sub>2</sub> et d'HbS grâce à un système d'élutions différentielles. Sachant que le taux d'HbA<sub>2</sub> au-delà duquel est évoquée une  $\beta$ -thalassémie hétérozygote est précis (3,5 %), il est important de passer régulièrement des contrôles, pour s'assurer de la qualité des résultats obtenus. Par ailleurs, il est possible grâce à cette méthode de quantifier le taux d'HbS afin de détecter les associations drépanocytose et thalassémies (Siguret et Andreux, 1997).

#### III-1-2-6- La chromatographie liquide sur colonne échangeuse de cations

Le principe de cette méthode repose sur la séparation de différentes fractions d'hémoglobine par un gradient de tampons de force ionique et de pH croissants, elle est automatisée et adaptée à de grandes séries, excellente précision pour le dosage des fractions HbA<sub>2</sub> et HbF, l'identification présomptive des variantes les plus courants HbS et HbC faite par leur temps d'élution à l'intérieur de « fenêtres » définies par le constructeur considérée par de nombreux laboratoires comme la méthode de choix pour dépister et quantifier les différentes fractions d'Hb normales et anormales (Vinatier, 2006).

#### III-1-2-7- La chromatographie liquide haute performance en phase inverse

Le principe de cette méthode repose sur l'étude séparative des chaînes de globine en fonction de leur hydrophobicité, elle est contribué à la séparation et l'identification des variants rares (exemple : HbS Antilles) Caractérisation des Hb fœtales (diagnostic de PHHF) (figure 16) (Vinatier, 2006).

### III-1-3- Les techniques hématologiques et biochimiques complémentaires

#### III-1-3-1- Le test de falciformation

La technique consiste à mettre en contact, sur une lame, une goutte de sang avec une goutte de métabisulfite de sodium, il permet de rechercher une drépanocytose. L'hémoglobine S et d'autres hémoglobines (comme l'hémoglobine C) ont une solubilité très diminuée quand elles sont désoxygénées. Les hématies qui les contiennent changent de forme et deviennent incurvées. La falciformation est décèle alors rapidement au microscope. C'est une technique très grossière qui ne permet pas de faire la différence entre drépanocytose hétérozygote et homozygote (figure 17) (Couprie, 2000).

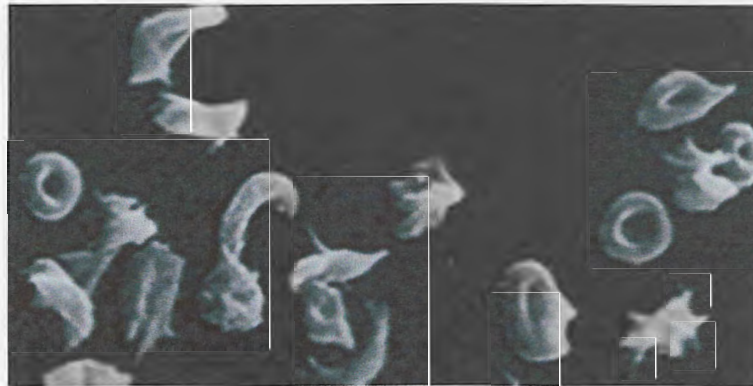


Figure16: Vue microscopique des hématies falciformes (Vinatier, 2006).

#### III-1-3-2- Le test de KLEIHAUER

Le principe est basé sur le non élution de l'hémoglobine F contenue dans les hématies en milieu acide. Le test utilise l'éthanol à 80% pour la fixation, une solution acide d'hématoxyline pour l'élution de l'hémoglobine A et de l'éosine à 0,5% pour la contre coloration. Les globules rouges ne contenant pas l'hémoglobine F sont incolores, seul leur contour est visible. Ceux qui contiennent l'hémoglobine F sont nettement colorés en rouge ou rose. L'Hb F est présente dans certaines hématies seulement lorsque la répartition est hétérogène et il est présente dans toutes les hématies lorsque la répartition homogène (Segbena et *al.*, 1997). Cette technique permet de préciser le caractère cellulaire ou hétérocellulaire d'une persistance héréditaire de l'hémoglobine foetale (PHHF) (Couprie, 2000).

#### III-1-3-3- Les tests permettant le dosage de l'hémoglobine F

Des tests classiques tels que le test Singer ou de Betke (ou étude de la résistance à la dénaturation alcaline) permettent de doser l'hémoglobine foetale. Dans un milieu fortement alcalin, l'hémoglobine se dissocie en hème qui s'oxyde en hématine et en globine qui se dénature. Hématine et globine dénaturée s'unissent pour donner la cathémoglobine. La cathémoglobinisation est totale à pH =13 et en une minute pour l'hémoglobine adulte et elle est négligeable dans ce même laps de temps pour l'hémoglobine foetale, ce qui donne une moyenne simple et caractéristique d'identifier la fraction foetale. Cette hémoglobine est en effet extrêmement résistante aux agents chimiques, en particulier aux alcalins. Cette alcalino-résistance de l'HbF, permet de la doser, après avoir élué les autres hémoglobines par une solution de soude. La technique de Betke qui a été décrite par ailleurs repose sur la propriété caractéristique de l'hémoglobine foetale de résister à la dénaturation acide. Dans les thalassémies ou dans les affections accompagnées d'une augmentation d'HbF, ce test met en évidence deux populations d'érythrocytes, les uns contenant HbF, les autres non. Dans la persistance héréditaire



d'Hb fœtale (PHHF), l'hémoglobine fœtale est répartie de façon homogène à citer de HbA dans toutes les hématies, obtient une seule population (North et al., 1995).

#### III-1-3-4- Le test de la stabilité de l'hémoglobine

L'instabilité de l'hémoglobine peut être appréciée par différents tests. Le test de dénaturation par la chaleur (incubation à 50 °C pendant 1 heure) de Grimes et Dacie est le plus utilisé. L'instabilité se traduit par l'apparition d'un précipité après incubation, ce phénomène ne se produisant pas avec une hémoglobine normale. Dans le test de Cardell, la précipitation de l'hémoglobine instable est obtenue par incubation avec l'alcool isopropylique à une concentration de 17% et une température de 37 °C. Egalement mettre en évidence l'instabilité spécifique de la chaîne mutée par le test au paramercuribenzote. Cet agent alkylant bloque les groupements SH de la chaîne mutée qui précipite après dissociation de l'hémoglobine ; dans les mêmes conditions, les deux chaînes séparées d'une hémoglobine normale demeurent solubles. Ces épreuves sont positives avec toutes les hémoglobines instables. L'instabilité de l'hémoglobine peut être également mise en évidence par les tests de solubilité de l'hémoglobine couramment utilisés pour le dépistage de la drépanocytose. Ces tests ne sont pas spécifiques de la drépanocytose et, dans une enquête systématique de dépistage, peuvent être faussement positifs chez un patient qui n'est pas drépanocytaire mais porteur d'une hémoglobine instable (Orsini et al., 1982).

#### III-1-3-5- Le test de stabilité de l'HbA

Par le test de précipitation à l'isopropanol à 17%, normalement l'HbA précipite après 50 minutes à 37 °C. L'instabilité de l'Hb anormale se manifeste par une précipitation plus précoce : la solution se trouble rapidement et le précipité floccule avant la 20<sup>e</sup> minute. L'HbS, HbF, HbC commencent à précipiter vers la 30<sup>e</sup> minute (Dieusaert, 1996).

#### III-1-3-6- La recherche de corps de Heinz

Les corps de Heinz sont des particules d'hémoglobine dénaturée qui ont précipité en dehors du cytoplasme des globules rouges, qui sont réunies en petits amas et que il retrouve attachées aux membranes cellulaires. Leur formation résulte d'une lésion médicamenteuse des globules rouges, de la présence de molécules instables d'hémoglobine, de la synthèse de chaîne déséquilibrée de globine due à une thalassémie ou d'une déficience enzymatique des globules rouges, comme une déficience en glucose 6- phosphate déshydrogénase (G6PD). Les corps de Heinz peuvent être décelés à partir d'un échantillon de sang entier (Lord, 1993).

#### III-1-3-7- Les cristaux d'hémoglobine C

Ces cristaux apparaissent comme des cristaux angulaires qui peuvent déformer l'hématie. Il est retrouvé chez les patients homozygotes, et à un moindre degré chez les patients S/C et C-thalassémiques (Fenneteau et Maier-Redelsperger, 2000).

#### III-1-3-8- Les corps de Pappenheimer

Ce sont des petits granules de 0.5 µm de diamètre, colorés en bleu par le MMG et regroupés au sein du cytoplasme. Ces granules, contenant du fer, sont colorés en bleu-vert par la coloration de perls. Ils sont retrouvés dans les anémies sidéroblastiques congénitales, les thalassémies et chez les patients drépanocytaires avec asplénie fonctionnelle (Fenneteau et Maier-Redelsperger, 2000).

### III-1-3-9- La courbe de dissociation de l'hémoglobine

L'étude de la fonction oxyphorique des hématies permet de distinguer chez un sujet cyanosique, une anomalie de l'affinité due à une Hb anormale ou une anomalie dans le métabolisme du 2-3 DPG (Kamoun et Fréjaville, 2002).

### III-2- Le diagnostic par la biologie moléculaire

Plus de 300 maladies génétiques humaines différentes sont causées par des mutations d'un seul gène. De fait, une maladie ou un dysfonctionnement dû à un gène défectueux apparaît dans environ 1% de la population humaine. Des mutations qui entraînent la synthèse de protéines anormales peuvent ainsi donner des maladies comme la drépanocytose (mutation de la  $\beta$ -globine des hématies). La détection d'une maladie génétique n'est pas toujours strictement dépendante des techniques de biologie moléculaire (Etienne et *al.*, 2006).

#### ➤ PCR : Polymerase Chain Reaction

Le principe consiste à faire le diagnostic de la mutation ponctuelle au niveau du gène de la drépanocytose par une nichée. Au cours de cette technique, le produit issu d'une première PCR est de nouveau amplifié à l'aide d'un second couple d'amorce, qui s'hybride à une partie interne (nichée) de la séquence amplifiée d'hybridation, elles se positionnent en face de leurs séquences complémentaires respectives. Puis en faisant agir une ADN Polymérase (Taq Polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'----- 3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié (Etienne et *al.*, 2006).

La mutation drépanocytaire conduit à la suppression d'un site de l'enzyme de restriction BsuI. Il est donc possible de détecter la présence ou l'absence de la mutation par l'utilisation de cette enzyme. La région contenant ce site de restriction est amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique du patient à tester (Efremov et *al.*, 1991).

#### ➤ Reverse dot- blot

C'est une méthode d'amplification par PCR et marquage d'un fragment cible d'ADN et l'hybridation sur un support portant des sondes spécifiques des principales mutations recherchées, elle permet de rechercher plusieurs mutations en une seule étape d'hybridation. Elle est utilisée pour l'identification des mutations  $\beta$ -thalassémiques les plus fréquentes dans les principales régions du monde et les diagnostics anténatal (Vinatier, 2006)

#### ➤ Méthodes d'amorçage allèle spécifique

Reposent sur le principe qu'une sonde pour PCR est d'autant plus efficace qu'elle est plus spécifique de la séquence à amplifier et qu'une sonde présentant une erreur d'appariement l'est moins, elles peuvent être recherchées simultanément dans une même PCR, elle est appliquée au diagnostic anténatal de drépanocytose (Vinatier, 2006)

#### ➤ Gap-PCR

Repose sur le principe que les sondes sont construites de façon à être complémentaires des frontières de la délétion et d'amplifier ainsi un fragment spécifique à la délétion et qui la recouvre. Dans le cas de délétions étendues, la distance entre les deux sondes est trop importante pour permettre l'amplification de l'ADN normal cette technique très importante dans les diagnostics anténatal des  $\alpha$ -thalassémies, certaines  $\delta\beta$ -thalassémie, des Hb Lepore et des PHHF délétionnelles (Vinatier, 2006).

➤ **Séquençage des gènes**

Elle repose sur l'amplification sélective des gènes  $\beta$ ,  $\alpha_1$  ou  $\alpha_2$  puis séquençage. Il est utilisé pour l'identification des variantes rares (Vinatier, 2006).

# ***Conclusion***

La connaissance des mécanismes des hémoglobinopathies permet d'expliquer et de justifier les signes biologiques de ces états pathologiques. Un homozygotisme ( $\beta$ -thalassémie homozygote) se traduit par une pathologie grave (diminution du taux d'hémoglobine, du nombre des hématies, du TCMH et de VGM). L'hétérozygotisme ( $\beta$ -thalassémie hétérozygote) est en générale mieux supporté, puisqu'il existe des formes clinicobiologiques muettes (pseudo polyglobulie, taux d'hémoglobine normale).

Notons également que des modifications apparences mineurs (changement d'un seul acide aminé) peuvent induire des pathologies très graves (drépanocytose homozygote) et les formes hétérozygotes (drépanocytose hétérozygote et l'hétérozygote C) sont porteurs de la maladie et sont cliniquement asymptomatiques. L'association d'une hémoglobine C et l'hémoglobine S est plus modérée que celui de la drépanocytose homozygote.

Ainsi l'exploration hématologique (l'héмограмme et examen des hématies sur frottis) et biochimique (l'électrophorèse) et par biologie moléculaire permet d'une part d'évaluer la prévalence des hémoglobinopathies et d'autre part préciser le type de l'anomalie hémoglobinique.

La prévention par le dépistage et le diagnostic prénatal est un moyen efficace pour permettre aux couples à risque pour les hémoglobinopathies d'avoir uniquement des enfants indemnes. La possibilité récente d'avoir recours au diagnostic préimplantatoire (diagnostic réalisé sur l'embryon obtenu par FIV) permet actuellement d'offrir de nouvelles alternatives aux familles opposées à l'interruption de grossesse. Par ailleurs, des progrès concernant le diagnostic prénatal sur les cellules embryonnaires ou fœtales circulant dans le sang maternel pourraient permettre dans un futur proche de s'affranchir des contraintes et des risques des prélèvements fœtaux.

Le diagnostic d'hémoglobinopathie est largement répandu et permet d'identifier tôt dans la vie les anomalies les plus graves. La détection précoce des sujets SS,  $S\beta^0$ , SD, SC, ou thalassémiques majeurs notamment, permet leur prise en charge dès le plus jeune âge par des équipes spécialisées. Des programmes de dépistage systématique par analyse du phénotype pendant la grossesse et à la naissance ont été mis en place pour les sujets à risque. La détection des hétérozygotes, asymptomatiques dans la plupart des cas, permet notamment de reconnaître les couples à risque et de leur proposer éventuellement un conseil génétique.

Pour éviter ou diminuer le pourcentage des enfants atteints par les hémoglobinopathies, la préférence est de faire un diagnostic prénatal qu'il est effectué par des techniques adaptées à partir de grossesse, de liquide amniotique ou de sang fœtal à partir de la 18<sup>e</sup> semaine. Il est indiqué chez les sujets drépanocytaires au fœtus à risque d' $\alpha$ -thalassémie majeure, au fœtus  $\beta$ -thalassémie. L'étude de la biosynthèse des chaînes de globine et l'utilisation des méthodes d'amplification génique, permettent la détermination des  $\alpha$ -thalassémie mineures, des délétions ou des additions de matériel génétique.



*Références*  
*bibliographiques*

- Aguilar-Martinez P. (2004)** Exploration de la pathologie érythrocytaire. Faculté de médecine Montpellier Nîmes. P: 2, 3,7.
- Allard J., Audebert P., Bauters E., Bauters F et al. (1997)** Lecture critique de l'hémoglobine. ANAES.
- Aubry P et Gauzère B. (2011)** Hémoglobinopathies. Diplôme de médecine Tropicale des Pays de l'Océane Indien. P: 3.
- Bach J.F., Imbert J.C., Jasmin C., Ménard J., Neveux J.Y. (1929)** Encyclopédie médico-chirurgicale. Edition scientifique et médicales Elsevier. Paris.
- Badens C., Thuret I., Lena-Russo D. (2000)** Les Syndromes Thalassémiques. *Revue Française des Laboratoires*. (324): 23.
- Bardakjian J., Benkerrou M., Bernaudin F., Briard M.L., Ducrocq R., Lambilliotte Léna-Russo A., de Montalembert M. (2000)** Le dépistage néonatal de la drépanocytose en France métropolitaine. 7. P: 1261–1263.
- Barro C. (2005)** Thalassémies. P: 3.
- Bellier S et Cordonnier N. (2010)** Les valeurs usuelles en hématologie. *Revue Francophone Des Laboratoires*. (420): 27.
- Benkerrou M., Brahimil., Denamur E. (1999)** Information génétique et diagnostic prénatal dans la drépanocytose. *Ann Pédiatr*. P: 46.
- Bernard Lévy J., Varet, B., Ctanvel J., Rain J. D., Sultan Y. (1998)** Hématologie. 9<sup>e</sup> édition. Masson. P: 116-118, 352.
- Binet Ch., Desbois I., Lamagnère J.P. (1990)** Hématologie pratique. Doin éditeurs. Paris. P: 32.
- Bordessoule D. (1992)** Anémie inflammatoire : physiopathologie, diagnostic. *Revprat*: 42.
- Boulanger P., Polonovski J., Tayeau F., Mandel P., Biserte G. (1977)** Biochimie médicale Masson. Paris.
- Bouvenot G., Devulder B., Guillven L., Queneau P., Schaeffe A.R. (1995)** Pathologie médicale. 4<sup>e</sup> édition. Masson. Paris. P: 398-399.
- Caquet R. (2004)** 250 Examens de laboratoire prescription et interprétation. 9<sup>e</sup> édition. Masson. Paris. P: 214.
- Couprie N. (2000)** Les hémoglobinopathies. Laboratoire marcel Mérieux. P: 5, 7, 9.
- Diakite S. (2005)** Les mécanismes de protection de l'hémoglobine C contre les formes graves d'alpaludisme A, P Falciparum : résultats d'études préliminaires in vitro. P: 41.
- Dieusaert P. (1996)** Guide pratique des analyses médicales. Edition Maloine. Paris. P: 537, 539,541.
- Dunod J. (2009)** Biochimie Générale. 11<sup>e</sup> édition. Paris. P: 116.

- Efremov D. G., Dimovski A. J. (1991)** Detection of beta- thalassaemia mutation by PCR amplified DNA with digoscigenin d dut p la belad oligonucleotide. *Hémoglobine*. P: 15, 325.
- Etienne J. (1999)** Biochimie génétique et biologie moléculaire. Masson. Paris. P: 199.
- Etienne J., Clauser E., Housset C., Roingeard P. (2006)** Biochimie génétique et biologie moléculaire. 9<sup>e</sup> édition. Masson. Paris. P: 218.
- Fenneteau O et Maier-Redelsperger M. (2000)** Apport de l'examen du frottis de sang de la pathologie le diagnostic constitutionnelle du globule rouge. *Revue Française des Laboratoires*. (324): 56.
- Galactéros F. (1995)** Drépanocytose. Physiopathologie et diagnostic. *Rev Prat*. 45: 351.
- Giroit R., Maier-redelsperger M., Neonato M. (2001)** Le diagnostic biologique des maladies génétiques de l'hémoglobine. *Revue Française des Laboratoires*. (329): 13.
- Grossely M et Orkin SH. (1993)** Regulation of the beta globin locus. *Curropin genet dev*: 232.
- Gulbis B., Cotton F., Vertongen F. (2004)** Hémoglobine anormales rares. *Rev Med Brux*: 4.
- Horn F., Lindenmeier G., Grilhosl C., Moc I., Berghold S., Schneider N., Munster B. (2005)** Biochimie humain. Edition Flammarion. Paris. P: 49, 492.
- Howard M.R et Hamilton P.J. (2004)** Hématologie. Elsevier, Paris. P: 32.
- Imbert M. (2008)** Difficultés de détection et d'interprétation des cellules anormales circulantes. *Revue Francophone Des Laboratoires*. (406): 73.
- Kafando E., Savadogo LGB., Ayéroué J. et al., (2008)** Les syndromes drépanocytaires majeurs : une enquête anonyme auprès du corps médical au Burkina-Faso. *Med. Trop*, 68: 241-246.
- Kamoun P et Fréjaville J.P. (2002)** Guide des examens de la boratoire. 4<sup>e</sup> édition. Flammarion. Paris. P: 785.
- Kamoun P et Lavoinne A. (2003)** Biochimie et biologie moléculaire. Flammarion médecine science. Paris. P: 315.
- Labie D et Elion J. (2005)** Base moléculaire et physiopathologique des maladies de l'hémoglobine, *EMC- hématologie2*: 220-239.
- Lainey E., Boirie M., Fenneteau O. (2009)** Hémogramme en pédiatrie variation physiologiques. Elsevier Masson Sas. P: 1.
- Langlois S., Fard J.C., chitayat D. (2008)** dépistage des porteurs de thalassémie et d'hémoglobinopathies au canada. *DIRECTIVE CLINIQUE COMMUNE SOGC-CCGM*. (218): 962, 964.
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M., (2000)** Principles of Biochemistry.3rd Ed."Ed. Worth Publishers. P: 85.
- Lelong M., Caddari F., Paulin C., Sancho J., Cailliez M. (2003)** Intérêt de l'étude du gène bêta globine dans le dépistage des hémoglobinopathies. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 18: 260-263.

- Lévy J.P., Varet B., clauvel J.P., Lefrère F. (2008)** Hématologie et transfusion. 2<sup>e</sup> édition, Masson. France. P: 108, 110, 120-122.
- Loustau V., Guillaud C., Garcon L., Godeau B., Michel M. (2011)** Anémie hémolytique chez l'adulte : principales causes et démarche diagnostique. *La Presse Médicale*. (5): 475.
- Margat W., Roderick R., Huntington F. (1992)** Génétique médicale. 5<sup>e</sup> édition. Médecine sciences Flammarion. Paris. P: 248.
- Marshall W.J et Bangert K. (2005)** Biochimie médicale physiologie et diagnostique. Edition Grafos. Espagne. P: 291-293.
- Mehta B.A et Hoffbrand A.V. (2003)** Hématologie. 1<sup>re</sup> édition. Boek université. Paris. P: 14.
- Médaille C., Abriend Marchel J-P., Braun J.-P. (2005)** Prélèvement sanguin. *EMC Vétérinaire*: 114.
- Michel G., Sébahoun G. (2005)** Orientation du diagnostic devant une anémie. Faculté de médecine. Marseille. P: 1, 5.
- North M.L., Piffaut M.C., Duwig I. (1995)** Hémoglobinopathies: actualisation du diagnostic biologique. *Revue française des laboratoires*. (275): 107,112.
- Orsini A., Perrinound H., Vovan L., Mattel M. (1982)** Hématologie perdiatrique. Flammarion. Paris. P: 47, 118.
- Raisonnier A. (2002)** Révisions biochimie PCEM2. Faculté de médecine. P: 20.
- Rivière I et Sadelain M. (1997)** Methods for the construction of retroviral vectors and the generation of high titer producers. In: Totowa. NJ. Gene therapy protocols: methods in molecular biology. Humana Press. P: 59-78.
- Rosa J., Wajcman H., Blouquit Y. (1993)** Hémoglobine. Édition technique. EMC. Paris. P: 11.
- Sadelain M. (2003)** Recent advances in globine gene transfert for the treatment of beta – thalassemia and sickle cell anemia. *CurrOpinHematol*. 13: 142-148.
- Segbena A.Y., Kueviakoe I., Mossiyamba S., Messie A.K., Vovor A. (1997)** Apport du test de Kleihauer dans le diagnostic des anomalies quantitatives de l'hémoglobine. *Médecine d'Afrique noire*, 44 (10): 502.
- Siguret V et Andreux J.P. (1997)** Diagnostic biologique des hémoglobinopathies par analyse du phénotype. Volume 55. N<sup>o</sup> 2. 103-12.
- Smaili F. (2003)** abrégé d'hématologie. Office des publications universitaires. Alger. P 27-29.
- Stryer L. (2003)** biochimie. 5<sup>e</sup> édition. Flammarion médecine sciences. Paris.
- Vanbourdolle M. (2007)** Biochimie hématologie. 3<sup>e</sup> édition. P: 6-1116.
- Vinatier I. (2006)** Recommandation pour la mise en œuvre et l'interprétation de l'étude de l'hémoglobine. 2<sup>e</sup> édition. Laboratoire CERBA. P: 12.
- Voet D et Voet JG. (2005)** biochimie . 2<sup>e</sup> édition. De Boeck et lancier. Bruxelles. P 320- 321, 340-341.

**Wajcman H; Riou J; Tapo AP. (2002)** Globin chain analysis by reversed phase high performance liquid chromatography: recent developments. *Hémoglobine*; 26: 271-84. Paris. P32.

**Wajcman H. (2005)** *Hémoglobine : structure et fonction*. 2: 145-157.

**Weinman S et Kamoun P. (2009)** *La biochimie de lubert stryer*. 3<sup>e</sup> édition. Médecine science Flammarion. Paris. P: 170.

**Zandeck M. (2006)** *Les syndromes thalassémiques*. Faculté de médecine. France. P: 1, 2.

**Zandecki M. (2006)** *Drépanocytose et principales autres hémoglobinopathies*. Faculté de médecine. Paris. P: 6.

**Zittoun R., Samama M.M., Marie J.P. (1998)** *Manuel d'hématologie*. 5<sup>e</sup> édition. Doin éditeurs. Paris. P: 88, 89.



# *Annexes*

	FNS	Hb%	VGM (fl)	HbA (%)	HbS (%)	HbF (%)	HbA2 (%)	HbC (%)	HbE (%)
<b>drépanocytose homozygote</b>	/	6 à 10	Normal	0	80 à 95	5 à 20	Variable	/	/
<b>drépanocytose hétérozygote</b>	/	6 à 10	Normal	60 à 65	35 à 40	Inférieure à 1	Variable	/	/
<b>HbS hétérozygote et <math>\alpha</math>-thalassémie associée</b>	/	Normal	sans carence martiale	60 à 75	30 et 35 (un seul gène $\alpha$ délété) 25-30 (2 gènes $\alpha$ délétés)	Inférieure à 1	Variable	/	/
<b>hémoglobinoses C homozygote</b>	Anémie (Hb > 8) microcytaire, CCMH élevée (38%), cellules cibles microspherocytes	/	/	/	/	Inférieure à 3	Inférieure à 3	Supérieure à 90	/
<b>hémoglobinoses C hétérozygote</b>	Normal, parfois discrète microcytaire	/	/	60 à 65	/	Inférieure à 1	Inférieure à 3	35 à 40	/
<b>HbC hétérozygote et <math>\alpha</math>-thalassémie associée</b>	Microcytaire sans carence martiale associée	/	/	60 à 75	/	Inférieure à 1	Inférieure à 3	30 et 35 (un seul gène $\alpha$ délété) 25-30 (2 gènes $\alpha$ délétés)	/
<b>hémoglobinoses E homozygote</b>	/	/	/	/	/	Inférieure à 15	/	/	Supérieure à 85
<b>hémoglobinoses E hétérozygote</b>	Normal ou microcytaire ou discrète anémie	/	/	70 à 75	/	Inférieure à 1	/	/	25 à 30
<b>HbE hétérozygote et <math>\alpha</math>-thalassémie associée</b>	Microcytaire discrète anémie	/	/	75 à 80	/	Inférieure à 1	/	/	20 à 25 (un seul gène $\alpha$ délété), inférieure à 20 (deux gènes $\alpha$ délétés)
<b><math>\beta</math>-thalassémies homozygote</b>	Anémie inférieure à 7, hypochromie, anisocytose et poikilocytose	60 à 80	/	/	/	augmentation	normal	/	/
<b><math>\beta</math>-thalassémies hétérozygote</b>	Anisocytose et poikilocytose	Normal ou discrète diminué (10 à 13)	Inférieure à 75	/	/	/	Supérieure à 3.5	/	/
<b><math>\beta</math>-thalassémies intermédiaires</b>	Anémie microcytaire (6 à 9)	/	/	/	/	augmentation	augmentation	/	/

<b><math>\alpha^+</math>-thalassémie (-<math>\alpha/\alpha</math>)</b>	Normale ou discrète microcytose ou discrète anémie microcytaire hypochrome	Normale chez l'adulte 1 % d'Hb Bart's a la naissance	/	/	/	/	/	/	/
<b><math>\alpha^0</math>-thalassémie hétérozygote (--/<math>\alpha</math>)</b>	Pseudopolyglobulie microcytaire hypochrome	Normal chez l'adulte 5 à 10 % d'Hb Bart's a la naissance	/	/	/	/	/	/	/
<b><math>\alpha^+</math>-thalassémie homozygote (-<math>\alpha/-\alpha</math>)</b>	Microcytose plus ou moins discrète anémie	Normale chez l'adulte 5 à 10 % d'Hb Bart's a la naissance	/	/	/	/	/	/	/
<b><math>\alpha^0</math>-thalassémie homozygote (--/--)</b>	/	Etude moléculaire indispensable	/	/	/	/	/	/	/
<b>Hémoglobine à affinité anormale</b>	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b><math>\delta\beta</math>-thalassémie homozygote</b>	microcytose	8 à 13	/	/	/	100	/	/	/
<b><math>\delta\beta</math>-thalassémie hétérozygote</b>	Microcytose isolée ou pseudopolyglobulie microcytaire hypochrome ou, plus rarement, légère anémie microcytaire	/	/	/	/	5 à 20	normal	/	/

# ***Glossaire***

**Anisocytose** : Inégalité de taille des éléments d'une population cellulaire, en particulier des érythrocytes.

**Collapsus vasculaire** : Syndrome consécutif à une insuffisance circulatoire grave, aboutissant rapidement à une anoxie tissulaire, avec acidose, augmentation de la perméabilité cellulaire, exsudation, hypovolémie, diminution du débit cardiaque.

**Cyanose** : Coloration bleuâtre, noirâtre ou livide de la peau, du fait de troubles circulatoires.

**Hyperplasie** : Prolifération anormale des cellules d'un tissu.

**Hypoxémie** : Diminution de la quantité d'oxygène transportée par le sang artériel, se traduisant par une diminution de l'apport d'oxygène aux tissus et aux viscères.

**Méningite** : Inflammation aiguë ou chronique des méninges. Une méningite est dite cérébrale, spinale ou cérébro-spinale selon que l'inflammation affecte les méninges de l'encéphale seul, de la moelle épinière seule ou de l'ensemble encéphale-moelle épinière.

**Nécrose** : Altération d'un tissu due à la mort des cellules qui le constituent.

**Ostéomyélite** : Inflammation pathogène des os.

**Paludisme** : Maladie parasitaire, endémique dans les régions humides et chaudes, provoquée par des hématozoaires inoculés par certains moustiques.

**Pneumopathie** : Terme générique désignant toute affection du poumon.

**Polychromatophile** : Qui peut se colorer par des colorants de différentes couleurs.

**Polycythémie** : Augmentation du nombre de globules rouges dans le sang circulant.

**Polyglobulie** : Maladie sanguine due à un excès de globules rouges.

**Proérythroblaste** : Cellule de la moelle osseuse représentant le premier précurseur de la série érythrocytaire. Le proérythroblaste est basophile, a un gros noyau et contient des nucléoles.

**Septicémie** : Développement pathologique de germes dans le sang.

**Splénomégalie** : Augmentation de volume de la rate.

**Thrombose** : Correspond à la coagulation du sang dans une cavité vasculaire (cœur, artère, veine, capillaire) au cours de la vie.

**Toxicité aiguë** : C'est la toxicité induite par l'administration d'une dose unique et massive de toxique, décrite comme la dose qui risque à 50 % de tuer un être vivant. Elle est parfois notée LD<sub>50</sub>, de l'anglais Lethal Dose 50 %.



<b>Réalisé par :</b> ❖ GHASMOUNE Aida ❖ LABIDI Sihem	<b>Encadreur :</b> <b>BENSEGHIER Salima</b>
	Date de soutenance : 28/ 06/ 2012
Thème : Etude des paramètres hématologiques dans le cas des hémoglobinopathies	

## Résumé

L'hémoglobine est un pigment de coloration rouge contenant dans les globules rouges (hématies) et permettant le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus. Une hémoglobinopathie appelée également hémoglobinose est une affection héréditaire sanguine concernant l'hémoglobine et dont la transmission est variable des parents aux enfants, selon la variété d'hémoglobinose, qui touche surtout les enfants.

Le développement de la recherche scientifique permettant la détection de ces maladies et ainsi la protection contre elle par la procédure des analyses biologiques, biochimiques et par biologie moléculaire, pour éviter ces conséquences graves, nous conseillons les couples de faire les analyses indispensables avant le mariage.

**Mots clés :** hémoglobine, hémoglobinose, drépanocytose, thalassémie, diagnostic.

## الملخص

الهيموغلوبين صبغة ذات لون أحمر محتوات داخل الكريات الحمراء وتسمح بنقل الأكسجين من الرئتين إلى الأنسجة. أمراض الهيموغلوبين عدوى وراثية يكون فيها الانتقال من الآباء إلى الأبناء، حسب تنوع هذا الأخير. التشوهات الأكثر انتشارا في العالم هي الطلاسمية والمنجلية، التي تمس خصوصا الأطفال.

التطور في مجال البحث العلمي يسمح بالكشف المبكر عن هذه الامراض وكذلك الوقاية منها وهذا بإجراء فحوصات بيولوجية كيميائية وعن طريق البيولوجيا الجزيئية من أجل تفادي هذه النتائج ننصح المقبلين على الزواج بالقيام بالتحاليل الضرورية قبل الزواج

الكلمات المفتاحية: الهيموغلوبين، أمراض الهيموغلوبين، الطلاسمية، المنجلية، تشخيص.

## Summary

Hemoglobin is a red pigment containing in red blood cells (RBCs) and allowing the transport of oxygen from the lungs to the tissues. Hemoglobinopathy, also called a hémoglobinose, is an inherited disorder concerning the blood hemoglobin and the transmission of which varies from parent to child, depending on the variety of hémoglobinose. The most frequent anomalies in the world are thalassemia and sickle cell disease, affecting mainly children.

The development of scientific research allowing the detection of these diseases and thus protection against it by the procedure of the biological, biochemical analyses and by molecular biology. To avoid these consequences, we advise couples to the necessary tests before marriage.

**Key words:** Hemoglobin, Hemoglobinose, sickle cell disease, thalassemia, diagnostic.