

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur
Et De La Recherche Scientifique
Centre Universitaire Mila
Institut des sciences et de la technologie
Département des sciences de la nature et de la vie
Spécialité -Biochimie-

Mini-projet-

Thème :

**Le diagnostic biologique de la drépanocytose, les types
d'analyses spécifiques biochimique en hématologie a
l'anémie drépanocytaire**

Présent par :

- AINOUSSE RIMA.
- BOUFAMA ASSIA.
- BOUABDALAH YUCEF

Promoteur : KELLAB RABEH

Année universitaire : 2011-2012

Dédicaces

Remerciement

Résumés (Arabe-Français-Anglais)

Liste d'abréviation

Table de matières

Introduction

Revue bibliographique

I-Généralités sur les maladies du sang

1-Définition d'une anémie

2-les différents types d'anémies

3-Répartition géographique

4-Les causes de l'anémie

5-Caractéristiques

II-Généralité sur la drépanocytose :

1-Définition

2- Les différents types de la drépanocytose :

3- Répartition géographique :

4- Caractéristiques

5-Physiopathologie

6- Diagnostic biologique

Partie pratique

I-Matériel et méthodes

1-Matériel

2-Méthodes

II-Résultats et discussions (interprétations)

1-Résultats

2 Discussions (comparaison avec les normes internationales) :

III- traitement et prévention

Conclusion

Références bibliographiques

Résumé :

Le sang est un tissu de nature conjonctive constitué d'éléments figurés baignant dans un liquide appelé plasma. Parmi ces cellules on a les globules rouges qui contiennent l'hémoglobine qui assure des rôles aussi primordiaux qu'indispensables. Cependant, ces hématies peuvent subir des mutations géniques dans une partie de l'ADN qui conduisent, ainsi, à un type d'anémie dit DREPANOCYTOSE qui donne une falciformation des globules rouges dans les zones où il y a un manque d'oxygène.

La drépanocytose, maladie dangereuse, s'avère très répandue dans la région de Mila car elle représente de 40-50%. Elle est transmise d'une génération à l'autre par voie génétique donc c'est une maladie hémolytique héréditaire. A cet effet, il faut qu'il y ait un suivi bien précis car une transfusion du sang est primordiale pour un drépanocytaire.

D'après les résultats obtenus il n'y a pas de différence entre homozygotes et hétérozygotes malgré que leur degré d'importance diffère de l'une à l'autre.

Il faut donc, essayer d'avoir des laboratoires d'analyse et d'entretien spécifiques à cette maladie ainsi qu'un personnel médical et paramédical qualifié pour dominer et stopper sa propagation. Alors que la première prévention du remède à cette maladie est d'éviter les mariages consanguins.

Summary:

Sickle cell disease, dangerous disease, is widespread in the region of Mila because it represents 40-50%. It is transmitted from one generation to another through genetic so it's a hereditary hemolytic disease. For this purpose, there must be tracked as a specific blood transfusion is essential for sickle cell.

According to the results there is no difference between homozygotes and heterozygotes despite their level of importance differs from one to another.

Therefore, try to have laboratory analysis and maintenance specific to this disease as a qualified staff to dominate and to stop spreading. While the first of a cure is prevention to avoid inbreeding.

ملخص

يعتبر الدم نسيج ضام حيوي مكون من خلايا تسبح في سائل يدعى بالبلازما و من بينها تميز الكريات الحمراء التي هي عبارة على حيز مملوء بالهيموغلوبين. هذا الأخير له دور اساسى و هام فى نقل الغازات من و الى الخلايا إلا انه تطراً عليه بعض التشوهات من جراء حدوث بعض الطفرات فى جزيء الحمض الريبى النووى المنقوص الاكسجين. و من بين هذه الاخيرة التى يحدث مرض فقر الدم الوراثى المسمى بال بالدريبانوستوز. ان هذا الاخير يحدث تشوهات فى الكريات الحمراء اذ يصبح لها شكل منجل فى المناطق قليلة التهوية لى يكون او يستوجب لهذا المرض علاجاً خاصاً و وقاية مستمرة بحيث تجنب المناطق غيرالمهوية واستخدام الهدروجين ال=ى يسمح للجلطات بالسريان لتجنب انسداد الاوعية الدموية.

وحسب النتائج المتحصل عليها على مستوى منطقة ميلة نلاحظ انه لا يوجد هناك فرق بين ال **Homozygotes**

و ال **Heterozygotes**

رغم أن درجة أهميتهما تختلف من واحدة لأخرى ولهذا يجب أن توفر مخابر للتحاليل المختصة بهذا المرض و كذا طاقم طبي و شبه طبي مختص للحماية من هذا الداء و انتشاره. وللوقاية يجب طلب التحاليل قبل الزواج وكذا محاولة منع الزواج من نفس العائلة.

-Liste des abréviations :

- CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
- CVO : Crise vaso-occlusive
- E DTA : Acide éthylène diamine tétra acétique
- FNS : Formule numérique sanguine.
- GB : Globules blanc
- Glu : Glucose
- GR : Globule rouge
- Hb : Hémoglobine
- HbA : Hémoglobine A
- HbA 2 : Hémoglobine A 2
- HbF: Hémoglobine F
- HbS: Hémoglobine S
- HCT: Hématocrite

- HPLC: Chromatographie en phase liquide à haute performance
- IDA: Iron defiviency anemia
- PLT : Plaquettes
- Val : Valine
- VGM : Volume globulaire moyen

Introduction :

Les maladies héréditaires de l'hémoglobine sont très répandues dans le monde. Chaque année, environ 350 000 nourrissons naissent avec des troubles ayant une relation avec une anomalie de l'hémoglobine dont les plus courantes sont la thalassémie et la drépanocytose.

En particulier drépanocytose vient du grec *drepanon* qui signifie « faucille », désignant la forme que prennent les globules rouges des malades qui se caractérise par une anomalie de l'hémoglobine que l'on appelle hémoglobine S .Il faut signaler que les deux principaux signes de la maladie sont l'anémie et les douleurs liées à l'obstruction des petits vaisseaux mais les manifestations de la maladie et ses causes sont perçues de façon différente.

Cette étude est proposée afin de répondre à la question suivante comment la drépanocytose est-elle perçue dans les familles atteintes et quelle est l'influence de cette perception sur l'adhésion aux soins ? Dans le cas de la drépanocytose, elle serait modulée par divers facteurs comme le contexte familial, sa relation, la stigmatisation perçue de la part de l'entourage envers les malades, ainsi que l'existence de complications graves et de symptômes dépressifs associés. Cette étude portera sur le diagnostic biologique de la drépanocytose tout en essayant de trouver les types d'analyses biochimique et hématologique appropriées et adéquats afin de détecter la maladie d'une façon plus performante. Tout en abordant une revue bibliographique pour ensuite répondre aux questions sus-citées.donc sur une évaluation de ces facteurs, ainsi que de l'observance thérapeutique.

Revue bibliographique

Aperçu général sur les maladies hématologiques

I-Généralités sur les maladies du sang :

Le sang est un tissu de nature conjonctive constitué d'éléments figurés capables de protéger l'organisme contre les corps nocifs. Cependant, différentes anomalies peuvent atteindre ses composants et seront à l'origine de différentes maladies graves comme les divers cancers sanguins et les anémies.

1-Définition d'une anémie :

Ce qui est important pour l'organisme est la quantité d'oxygène transportée par les globules rouges grâce à l'hémoglobine qu'ils contiennent, en conséquence, seul compte le taux d'hémoglobine par unité de volume. Une anémie est définie par la diminution de la quantité totale d'hémoglobine intra érythrocytaire normalement présente dans le sang. Elle est évaluée à un taux égal à la teneur en hémoglobine par globule rouge multiplié par le nombre de globules rouges contenus dans une unité de volume de sang (100 ml)

Elle est définie, donc, par le taux d'hémoglobine par unité de volume de sang inférieur aux valeurs physiologiques de référence qui varient en fonction de l'âge, du sexe et de l'état de gravidité chez la femme

On parle, ainsi, d'anémie au-dessous de 13 g d'hémoglobine/100ml de sang chez l'homme adulte, au-dessous de 12 g/100ml de sang chez la femme et l'enfant > 6 ans, au-dessous de 13,5 g/100ml de sang chez le nouveau-né. Selon l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES), les valeurs seuil du taux d'hémoglobine en fonction de l'âge et le sexe sont données dans le tableau 2. (BERTHOU-2006)

2. les différents types d'anémie :

2.1. L'anémie par carence en fer (anémie microcytaire ou ferriprive) :

C'est l'anémie la plus courante, caractérisée par un VGM (volume globulaire moyen) et une CCMH (concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine) inférieurs à la moyenne. Les règles abondantes, la grossesse et l'ulcère hémorragique sont à l'origine de ce type d'anémie. Selon Solange Liozno-2010

2.2. L'anémie macrocytaire :

Elle est caractérisée par une carence en vitamine B12 ou en acide folique et un VGM important mais une mauvaise alimentation et une hypothyroïdie peuvent aussi être à l'origine de cette maladie selon Solange Liozno-2010

2.3. L'anémie hémolytique :

C'est une maladie d'origine héréditaire ou acquise qui se traduit par une destruction exagérée des globules rouges selon Solange Liozno-2010

2.3.1. Origine héréditaire :

Parmi celles-ci il faut signaler les plus importantes dont la drépanocytose (fréquente chez les personnes d'origine africaine) et la thalassémie (défaut de synthèse de l'hémoglobine fréquent chez les personnes d'origine africaine et asiatique) selon Solange Liozno-2010

2.3.2. Origine acquise :

Le paludisme, le venin de serpent, une micro angiopathie et certains antibiotiques peuvent déclencher une anémie hémolytique selon Solange Liozno-2010

2.4. L'anémie aplasique (aplasie médullaire) :

Elle se traduit par une pathologie grave due à une incapacité de la moelle osseuse de produire des cellules sanguines.

Maladie auto immune. Elle peut aussi être secondaire à une chimiothérapie ou une radiothérapie selon Solange Liozno-2010

3. Répartition géographique

Tableau 1 : Prévalence estimée (%) (Katin et Coman 2010)

Age Zone	Enfant 0-4 ans	Enfant 5-12a	Adulte H 15-59a	Adulte F 15-59a	F enceinte
Asie	56	50	32	58	65
Afrique	56	47	20	44	63
Europe- Amérique	12	7	3	11	14

4-Les causes de l'anémie :

Selon Rongère et Tavalacci (2011) les principales causes des différentes anémies sont :

4-1-Les trois grandes causes d'anémie

4-1-1.La carence en fer ou iron deficiency anemia (IDA)

Elle représente 50% des anémies dans le monde d'où la carence nutritionnelle reste le premier facteur mondial soit 60-80% cependant, les parasitoses intestinales sont aussi responsable de ces maladies.

4-1-2. Le paludisme :

Il faut signaler que dans toutes les zones endémiques, l'incidence de l'anémie est importante car le paludisme s'avère un facteur primordial dans l'apparitions de cette anémie (Wend-yam Tiemtor 2008).

4-1-3. grossesse - accouchement – post- natal :

L'anémie par IDA touche 40-80% des femmes enceintes.

- Tableau N° 2 : Autres grandes causes de l'anémie (Rongère et Tavalacci 2011)

Pertes de sang	Production réduite	Destruction majorée
cancers, hémopathies trouble crase sanguine	hémopathies malignes, envahissement médull. aplasie médullaire	cancers, hémopathies
	Carences : folates, B12	
parasitoses : schisto	infections persistantes : VIH, autres virus	splénomégalies (toutes causes (hypersplénisme)
maladies digestives	mal inflammatoires et auto-immunes	mal. auto-immunes
	insuffisance rénale chronique	
médicaments	médicaments et toxiques	médicaments et toxiques

5-Caractéristiques :

5-1- Signes :

Ils sont représentés par : pâleur, tachycardie, souffle, urines rouges (hémolyse), peau et muqueuse (Atul.B Metha, A.Victor Hoffbrad-2006)

5-2- Symptômes :

Les anémies sont caractérisées par : asthénie / fatigue, vertiges, dyspnée d'effort (Effort impossible), tachycardie. (Atul.B Metha,A.Victor Hoffbrad-2006)

II-GENERALITES SUR LA DREPANOCYTOSE :

1). Définition :

Elle est considérée, selon Zandecki (2006), comme une anémie hémolytique corpusculaire constitutionnelle liée à une anomalie de structure de la chaîne β de la globine ou encore maladie génétique autosomique récessive par mutation du gène de la β globine.

2). Les différents types de la drépanocytose :

2.1. Drépanocytose homozygote (S/S) :

Les individus héritant deux gènes défectifs sont appelés "homozygotes" (du grec, homs, le même) et montrent les signes cliniques de l'anémie falciforme, (Rawn 1990, Thompson et al 1995). La maladie sévère, a une distribution géographique caractéristique survenant en Afrique aquatile et moins fréquente dans la région méditerranéenne et en Inde. Environ un noir américain sur 600 naît avec cette maladie souvent fatale au cours du début de l'enfance, bien qu'une survie plus longue soit de plus en plus fréquente (Dounart et al 1981, Sultan et al 1994, Thompson et al 1995). La maladie homozygote se révèle le plus souvent dans l'enfance par une pâleur, un subictère et parfois une grosse rate. Elle peut entraîner des douleurs osseuses avec des lésions portiques (tous dans l'os) ou nécrosantes avec des crises douloureuses abdominales, des ulcères aux jambes, une insuffisance cardiaque, des lésions pulmonaires et rénales, une lithiase de la voie biliaire et une altération de l'état général (Thompson et al 1995, Boeker et al 1999).

2.2 .Drépanocytose hétérozygote (A/S) :

Les individus héritant d'un chromosome défectif et d'un chromosome normal sont porteurs du trait drépanocytair.ces hétérozygotes (du grec, heteros, autre) présentent peu, Sinon aucun des symptômes de l'anémie falciforme toutefois, une atteinte se manifeste par

des troubles du pouvoir de concentration et un défaut d'acidification des urines. De plus, les hématuries micro- et macroscopiques sont aussi fréquentes ; elles témoignent de micro-infractissement médullaires. En outre, il semblerait que certaines manifestations vaso-occlusives comme l'infarctus splénique, les situations d'hypoxie (passage en haut altitude ou prolongement sous-marin), ainsi que des exercices intenses favorisent ces accidents. (Douarnt et *al* 1981, Thompson et *al* 1995).

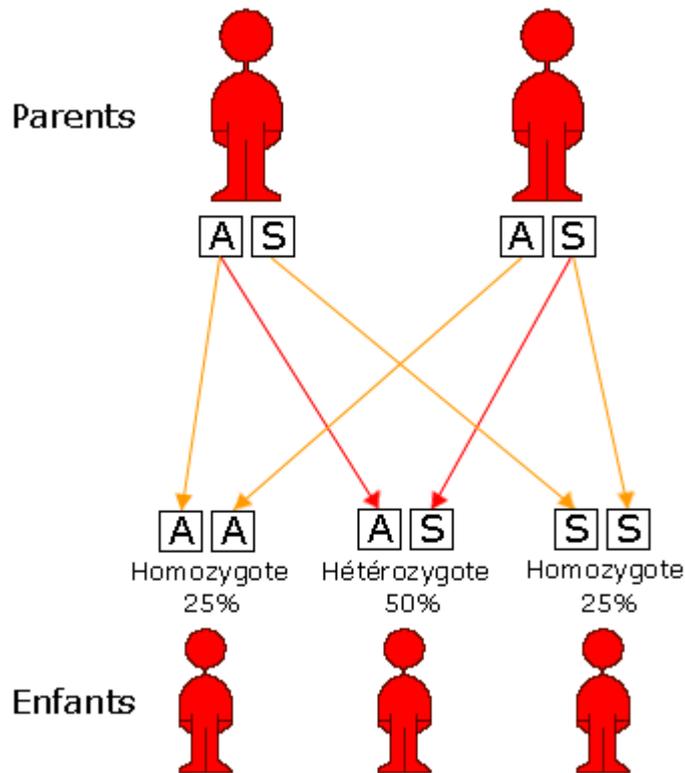
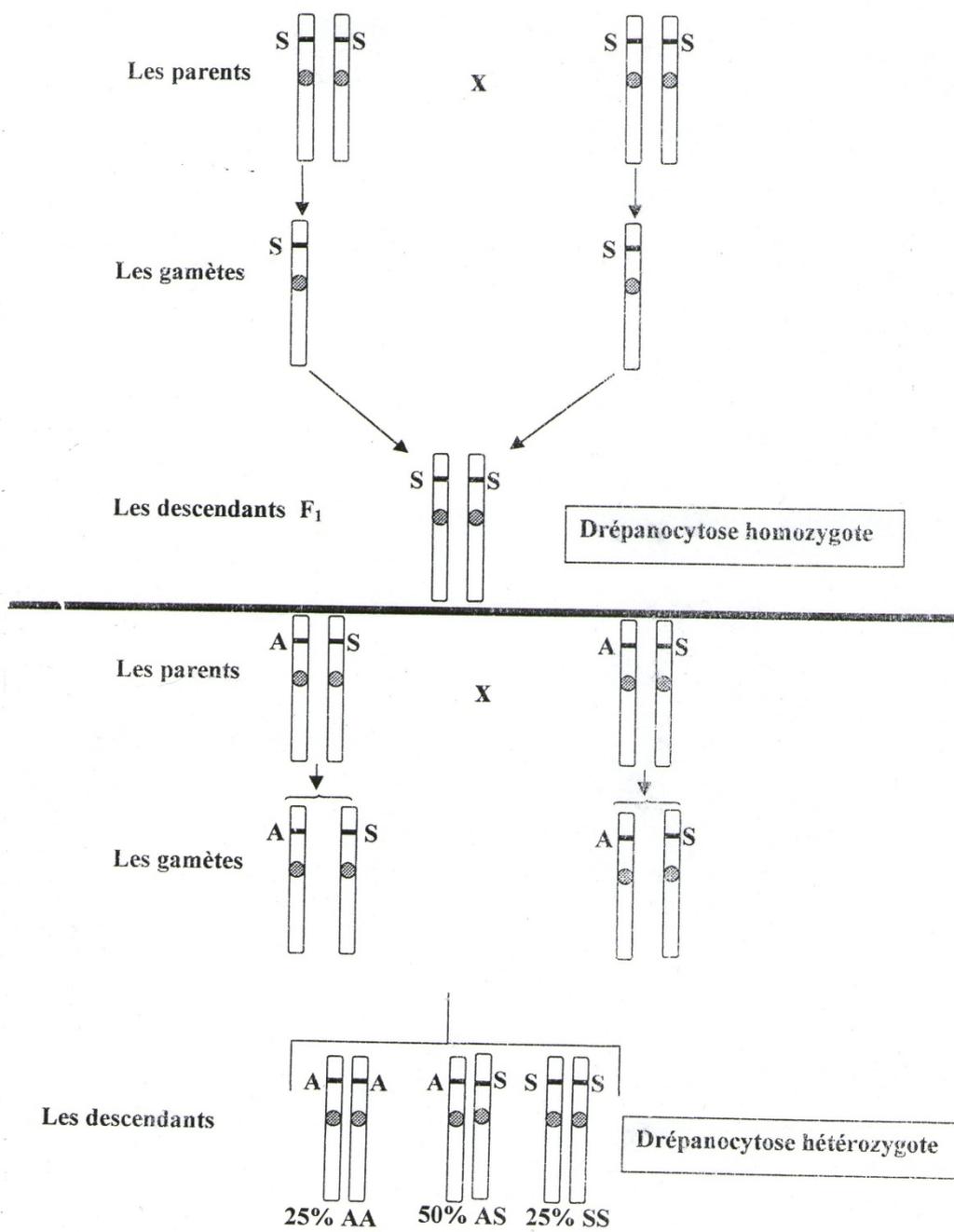


Figure 1 : Mode de transmission autosomique récessif (D.Voet J.G. Voet 2010)



**Fig.1 La transmission génique de la drépanocytose homozygote et hétérozygote
Harrison 1993**

2.3. Drépanocytose composite (S/C, S/B thalassémie et S/O (arab))

Les patients hétérozygotes pour l'HbS et pour l'hémoglobine C ou hétérozygotes pour l'HbS et pour l'hémoglobine O (arab) et les hétérozygotes pour l'HbS et pour une β thalassémie, doivent être considérés comme des drépanocytaires homozygotes sous l'angle de mesure préventive à leur appliquer et des conseils à leur donner (Wajcman et *al* 1992). En effet, ces sujets ont une symptomatologie clinique aiguë et chronique similaire à celle des drépanocytaires homozygotes. Les patients drépanocytaires S/C sont atteints d'une splénomégalie, présentent des complications chroniques oculaires tel la prolifération des arcades vasculaires dans le vitré et osseuse que les drépanocytoses homozygotes. Ainsi les nécroses de la tête fémorale seraient plus fréquentes et en rapport avec une viscosité sanguine plus élevée chez ces patients. Cependant, les patients drépanocytaires S/ β thalassémies ont également une splénomégalie au-delà de la petite enfance, souvent responsable d'un hypersplénisme qui majore l'anémie et peut réclamer des transfusions fréquentes (Wajcman et *al* 1992, Sultan et *al* 1994, Thompson et *al* 1995). Alors que les patients drépanocytaires S/O (arab) ont une rétinopathie, des syndromes thoraciques, compris des crises cardiaques, des vaso-occlusions, des lithiases biliaires, une atteinte rénale, d'ostéomyélites, d'accident cérébro-vasculaire, d'ulcère de jambes, d'une dactylite, des nécroses vasculaires et des crises aplasiques (Zimmerman et *al* 1999).

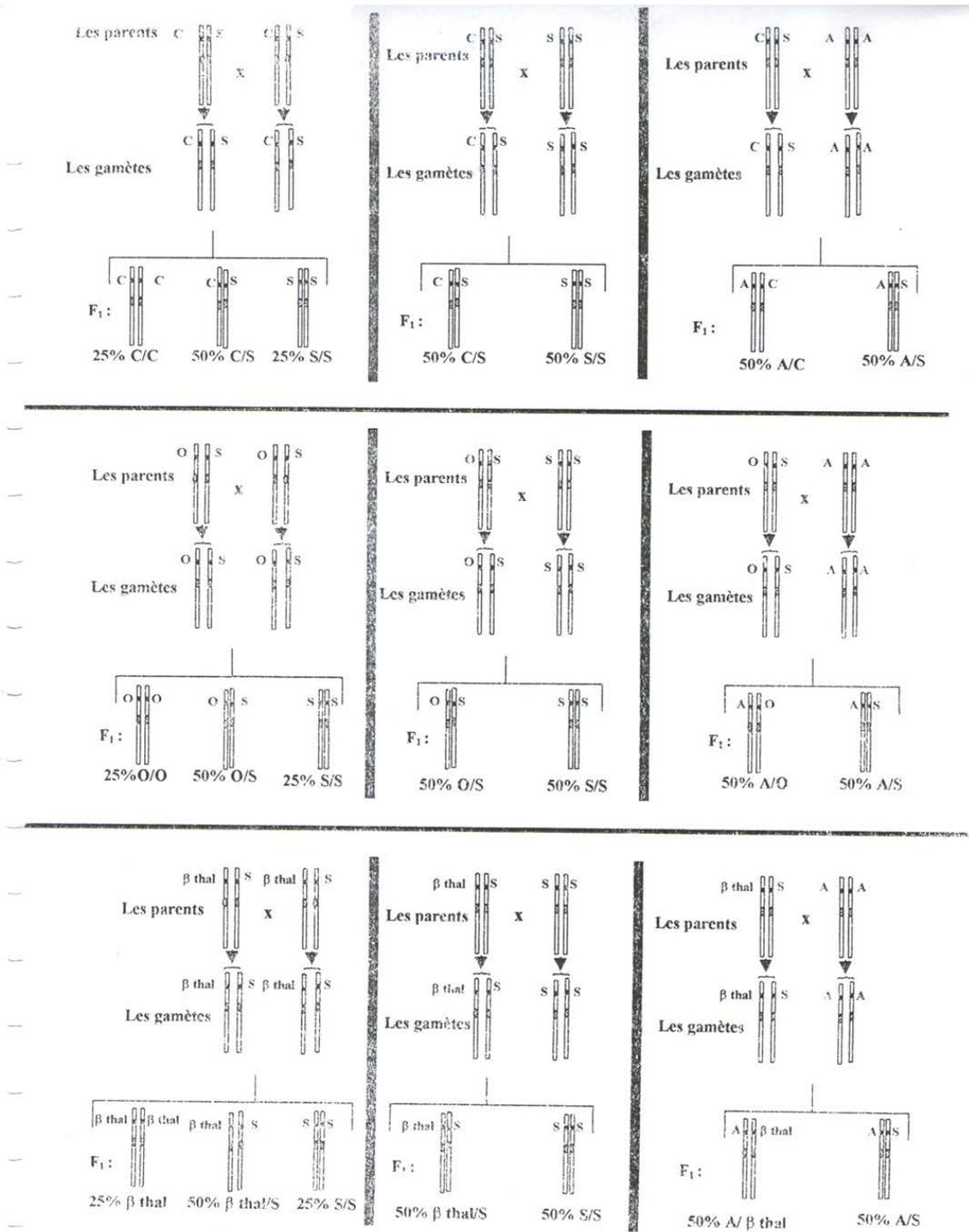


Fig. La transmission génétique de la drépanocytose composite
Harrison 1993

3- Répartition géographique :

La même source signale que c'est une maladie héréditaire, très répandue dans le monde comme l'Afrique équatoriale, l'Afrique sub-saharienne, les pays méditerranéens, en particulier les zones côtières, le Moyen Orient, le continent indien, les zones de migration de ces populations (noirs américains) et les Antilles

En Afrique équatoriale, par exemple, on note une plus forte incidence de drépanocytose dans les régions impaludées par *P falciparum* (agent pathogène qui digère mal l'Hb S et ne peut pour suivre son cycle dans les globules rouges contenant l'HbS).

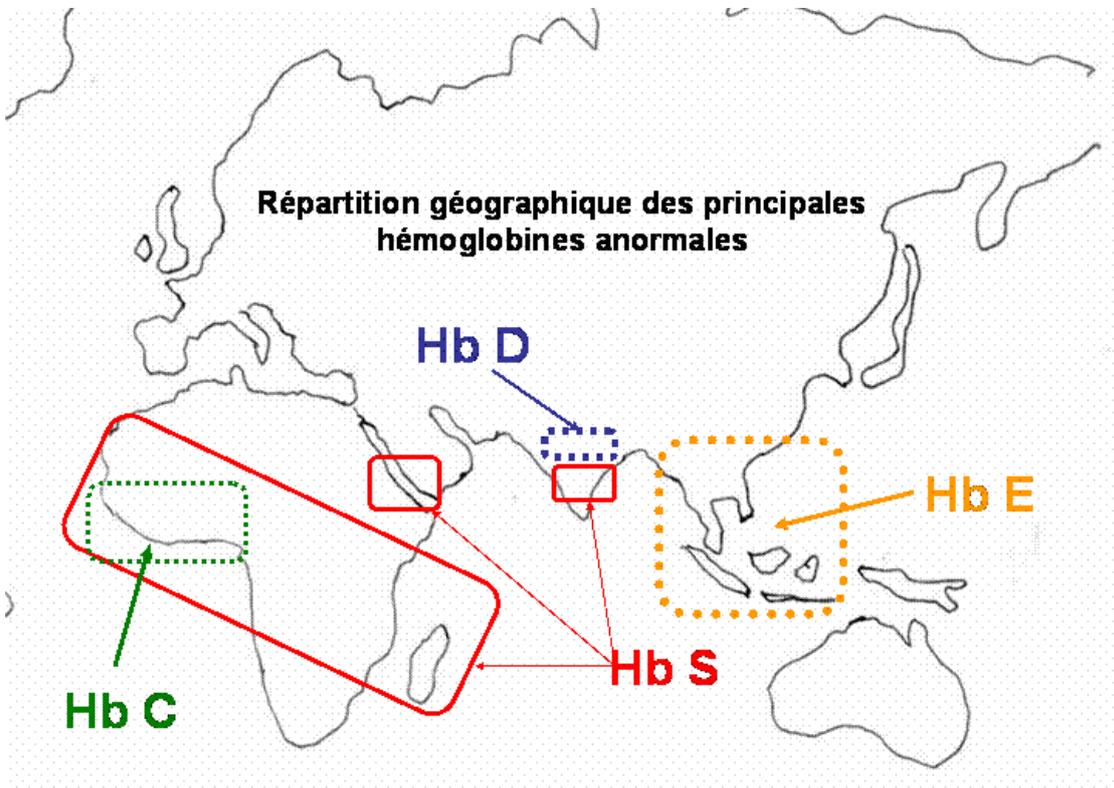


Fig.4-répartition géographique des principales hémoglobines anormales(Paolo Larizza 2001)

4- Caractéristiques :

La mutation du gène de la β globine induit la synthèse d'une hémoglobine (Hb) anormale l'HbS, principalement responsable de l'ensemble des manifestations cliniques vaso-occlusives et d'une hémolyse chronique avec anémie de degré variable.

Cependant, les syndromes drépanocytaires majeurs regroupent trois formes génétiques principales à savoir homozygotie S/S, hétérozygotie composite S/C et S/ β^0 ou S/ β^+ thalassémies ou les plus critiques sont les homozygoties S/S ainsi que les S/ β^0 thalassémies

La confirmation du diagnostic de la drépanocytose repose sur l'étude de l'hémoglobine :

---Elle doit être pratiquée à distance d'une transfusion pour qu'elle puisse confirmer la présence d'HbS (90 % chez les homozygotes) et que le taux d'HbF résiduel ait une incidence sur la fréquence des crises.

--- Les sujets hétérozygotes AS, porteurs d'un signe drépanocytaire, sont généralement asymptomatiques. A cet effet, ils doivent être dépistés pour leur donner accès à une information génétique.

--- Un conseil génétique est utile et doit être proposé aux couples à risque car son principal objectif est de donner aux parents toutes les informations leur permettant d'exercer un libre choix éclairé et dans le cas échéant, de recourir au diagnostic prénatal

--- La drépanocytose de l'adulte est une maladie complexe dont la charge est multidisciplinaire.

--- Il faut signaler que le diagnostic, la prescription des traitements spécifiques, l'organisation du suivi pluridisciplinaire clinique et para clinique reviennent au médecin spécialisé. Ce dernier intervient en coordination avec le médecin traitant qui joue un rôle essentiel notamment pour la prise en charge des aspects psychologiques, la surveillance thérapeutique, la conduite du programme vaccinal et la reconnaissance des situations d'urgence. Selon(Robert Givot et Pierre Bégué et al)

5-Physiopathologie :

L' HbS est le résultat d'une substitution de l'acide glutamique (chargé négativement) par une valine (neutre), au niveau du sixième acide aminé du segment A de la chaîne β :



Il faut ajouter aussi qu'en milieu désoxygéné l'Hb anormale se polymérise et se colle à la membrane de l'hématie .A cet effet, il résulte une altération de la fonction membranaire

avec augmentation de la perméabilité aux ions, une déshydratation et une cristallisation de l'HbS avec déformation caractéristique irréversible de cette cellule en faucille appelée drépanocyte. Elles seront ainsi éliminées rapidement (phagocytes) mais celles qui sont peu déformées provoquent une hyperviscosité du sang avec complications vaso-occlusives.

La transmission autosomique est caractérisée par des hétérozygotes AS cliniquement sains, alors que les homozygotes SS sont malades cependant, d'autres anomalies de l'Hb peuvent s'associer à la drépanocytose telles que HbC, β ou α -thalassémie (doubles hétérozygotes).

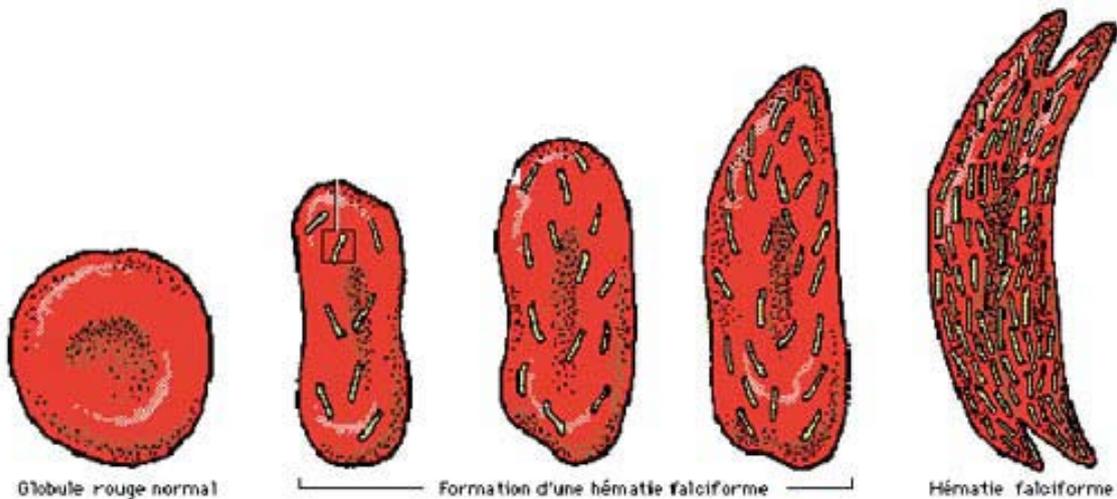


Fig.5 : Physiopathologie (Mélanie Avakian 2009)

6- Diagnostic biologique

6-1- Drépanocytose hétérozygote

Il est réalisé surtout lors d'une enquête familiale et repose sur :

6-1-1- Hémogramme :

Il doit être normal, et une morphologie conforme des globules rouges.

6-1-2- Test de falciformation ou test d'EMMEL ou test au métabisulfite:

Il consiste en un dépôt entre lame et lamelle d'une goutte de sang EDTA et une autre de la solution réductrice de métabisulfite, qui consomme l'oxygène du milieu, entraînant ainsi la cristallisation de l'Hb et la falciformation (après 10 minutes au moins une partie des hématies est drépanocytaire)

6-1-3- Test de solubilité d'ITANO :

L'HbS est seule à précipiter en milieu réducteur à forte concentration saline avec une turbidité de la solution proportionnelle à la quantité d'Hb S.

6-1-4- Electrophorèse de l'hémoglobine :

Qu'elle soit en acétate de cellulose à pH alcalin ou citrate agar en pH acide, ou **isoelectrofocalisation** ou **HPLC**. Drépanocytose hétérozygote l'HbS est de 30 à 45% et l'HbA est de 55 à 70%.

6-2-Drépanocytose homozygote

6-2-1-Hémogramme :

- Anémie : Hb= 7 - 9 g/dl
- Normochrome (CCMH > 31 – 32%)
- Normocytaire : VGM normal
- Régénérative : réticulocytes = 200 - 600 G/L
- --Frottis sanguin.
- Hyperleucocytose sans infection (15 à 20G/l)
- --Plaquettes : 300 – 500 G/L
- VS : Elle est normale (les GR ne forment pas d'empilements, même en cas d'état inflammatoire)

6-2-2-Test de solubilité d'ITANO positif:

Il atteste la faible solubilité de l'HbS à l'état désoxygéné.

6-2-3-Electrophorèse de l'hémoglobine :

- HbS est de 80 – 95 % et absence d'HbA
- HbF = 1 à 10% HbA2 = 2 à 4%

6-3- Diagnostic prénatal

Il peut être réalisé chez les couples d'hétérozygotes. La biologie moléculaire permet de faire le diagnostic vers la 10ième semaine de grossesse (à partir d'une biopsie de villosités choriales).

Les techniques moléculaires utilisent la mutation du gène comme un site de clivage de l'enzyme de restriction Mst II (ce qui produit un fragment d'ADN anormalement long), ou utilisent des oligonucléotides spécifiques de la région de mutation (PCR).

6-4- Diagnostic à la naissance :

Il permet la prise en charge avant l'apparition des signes cliniques.

Les techniques d'iso- électro- focalisation sont plus performantes pour identifier les fractions très modérées avec moins de 10% HbS (prélèvement de goutte de sang sur buvard puis récupérer l'hémolysat).

La partie pratique

L'étude s'est déroulée au laboratoire d'analyses de hôpital de Mila qui comporte plusieurs sections à savoir : la Biochimie où nous avons effectué l'électrophorèse et, l'hématologie où le test de falciformation et l'hémogramme.

I-Matériel et Méthodes :

1-Matériel :

1-1-Produits chimiques et réactifs :

-Kit applicateur -Marqueur.-met bisulfite de sodium- EDTA- huile d'immersion-diluant, réactifs de lyse-bandes à pH alcalin

1-2-la verrerie :

-tubes, pipettes, micropipettes, pipettes Pasteurs-Micropipette de 0-10 μ l-Bacs de coloration-Portoir (porte bande)-Tubes capillaires de 10 μ l-Chronomètre-Pipette de 1000 μ l, 200 μ l, et 100 μ l

1-3-Appareillage :

Automate (CELL-DYN-1700)- centrifugeuse-électrophorèse- microscope optique- Coulter-counter -Générateur-Chambre de migration-Etuve auto réglable jusqu'à 60°C

2-Méthodes :

2-1-FNS (formule numérique sanguine) :

Prélèvement du sang dans un tube a EDTA (anti coagulant) qui sera mélange manuellement ensuite mise du mélange dans le Coulter-counter ayant une aiguille. Après, un click sur le bouton d'où sortie de l'aiguille et donc absorption de 20 μ l de sang qui seront mis dans les solutions détergent, lyse et diluant dont chacun a sont propre tuyaux. Cet appareil nous donne directement les résultats de la FNS qui sont les globules blancs, rouges, les plaquettes, l'hématocrite et l'hémoglobine.

Alors que manuellement pour l'hématocrite on prend le tube bien mélange qui sera penché légèrement pour faciliter l'absorption de la solution par les tubes capillaires de façon a ce que ces derniers soient remplis au 2/3 alors que le 1/3 restant est vide ensuite on bouche le tube a l'aide d'une pate .Ce dernier sera centrifuge d'hématocrite a 1800

trs/mn après avoir équilibrer avec un autre tube .On laisse reposer la solution centrifugée pendant 3 mn, sur une plaque graduée de 0 a 100 on le fait passer sur celle-ci de façon a ce qu'il y ait un frottement entre eux. Il va y avoir le dépôt du sang sur le 0 et le dépôt du sérum sera termine au 100.La lecture de l'hématocrite sera donnée en pourcentage (fin du dépôt du sang).

2-2-Electrophorèse :

2-2-1-Principe :

L'électrophorèse permet de sépare les hémoglobines, d'identifier les fractions d'hémoglobine et de déterminer le pourcentage relatif de chacune d'elles.

Les fractions que nous avons recherchées sont (HbA1), (HbF), (HbS),
(HbA2).

Elle permet de poser le diagnostic en mettant en évidence la présence d'une fraction d'hémoglobine de migration différente des hémoglobines normales.

Elle permet également de différencier les formes homozygotes des formes hétérozygotes, ainsi que la présence éventuelle d'une autre anomalie de l'hémoglobine associée (autres mutations ou thalassémies).

- Le sang veineux est prélevé sur anticoagulant, principalement EDTA (ethyl-diamine-tetra-acétique) qui permet d'effectuer sur le même tube une FNS (formule numération sanguine).

- Le sang est ensuite lavé en eau physiologique et les hématies sont lysées. Ce hémolysât permet l'étude de l'hémoglobine.

- L'électrophorèse de l'hémoglobine permet d'obtenir une séparation des différentes hémoglobines selon leur charge électrique et leur poids moléculaire.

Elle peut être pratiquée :

- Sur acétate de cellulose en milieu alcalin à PH 8.6 (technique la plus utilisée)
- Sur acétate de cellulose en milieu alcalin à PH 8.6 (technique la plus utilisée).

- Sur agarose en milieu acide à PH 6.2 qui permet de confirmer certaines hémoglobines anormales, en particulier en séparant les HbS, HbD, HbC, et HbE.

Le diagnostic de drépanocytose est confirmé par la présence majoritaire d'hémoglobine (S).

Chez le sujet hétérozygote le taux de (S) est inférieur à 30% pratiqué sur acétate de cellulose.

L'hémoglobine normale adulte est composée d'hémoglobine (A) en grande majorité avec un taux d'hémoglobine (A2) inférieur à 3.5%.

Le sujet drépanocytaire ne possède pas de l'hémoglobine A dans le cas de l'homozygote, mais il existe un taux variable de l'hémoglobine (F) chez le sujet normal, l'hémoglobine F ou appelée encore hémoglobine f tale, est présente en grande quantité à la naissance et le taux diminue progressivement pour disparaître vers l'âge d'un an.

Matériel :

- Générateur
- Chambre de migration
- Kit applicateur
- Micropipette de 0-10 μ l
- Bacs de coloration
- Portoir (porte bande)
- Tubes capillaires de 10 μ l
- Etuve auto réglable jusqu'à 60°C
- Chronomètre
- Pipette de 1000 μ l, 200 μ l, et 100 μ l
- Marqueur.

Réactifs et consommables :

- Bande acétate de cellulose (portant 8 échantillons)
- Tampon buffer (dissoudre 1 sachet dans 1000 ml d'eau distillée sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète).
- Solution colorante ou rouge ponceau (dissoudre 1 sachet dans 1000ml d'eau distillée) puis agiter 30 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique, afin de rendre homogène).

Le mélange peut être conservé pendant 6 mois à température ambiante et à l'abri de la chaleur de la lumière et de l'humidité.

- Papier buvard
- Papier contacte de la chambre
- Méthanol pur à 99%
- Acide acétique glacial pur
- Lames
- Réactif hemolysât ref 5127
- Réactif clear aid ref 5005
- Hémocontrol (pour la calibration)

Tableau N° :3

AA ₂	Réf 5324
ASA ₂	Réf 5329
AFSA ₂	Réf 5330
AFSC	Réf 5331

L'hémocontrol est un sang humain traité (lavé 3 fois avec de l'eau physiologique (Na Cl à 90/00) Puis dilué dans l'hémolysât à proportion de 1 volume pour 6 volumes

Il est utilisé pour la comparaison des différentes fractions de l'hémoglobine.

Tableau N° :4 Concentration de l'hémocontrol: en pourcentage (%)

	A ₁	F	S	C	A
ASA ₂	52.0	-	45.4	-	2.6
AFSA ₂	39.0	26.7	31.1	-	3.2
AFSC	78.0	9.4	4.8	7.8	-
A ₁ A ₂	97.1	-	-	-	2.9

2-2-2-Techniques :

Nous travaillons sur un sang prélevé sur EDTA (éthyl-diamine-tétra-acétique).

Technique des électrophorèses d'hémoglobine sur bandes d'acétate de cellulose :

2-2-3-Mode opératoire :

- Verser approximativement 50 ml de solution tampon à PH 8.2-8.6 dans chaque compartiment de la chambre de migration.
- Tromper deux ponts de papier dans le tampon, puis disposer chacun par-dessus chaque cloison en s'assurant qu'ils soient en contact avec le fond du compartiment contenant le tampon.
- La chambre de migration est donc prête pour l'électrophorèse et doit être tenue couverte en cas de non utilisation.
- Tremper pendant 15 mn le nombre désiré de bandes d'acétate, descendre lentement le portoir de bandes de façon progressive dans le tampon en évitant de provoquer des bulles d'air qui détériorent la bande.

1. Préparation de l'hémolysât:

On utilisera, alors soit : sur sang total :

- 3 volumes de sang
- 6 volumes d'hémolysât.

Ou mieux encore en lavant les globules rouges à l'aide de Na Cl à

9%, trois fois, puis on jette le surnageant et on distribuera :

- 1 volume de sang (Pack GR)
- 6 volumes d'hémolysât

Laisser reposer 6 à 10 mn afin d'avoir une hémolyse totale. Après

Le temps écoulé, utiliser une micropipette graduée à 5 μ l et répartir chaque malade dans le puits du plateau d'échantillon.

- Sortir la bande acétate du tampon, sécher entre deux buvards neufs et calibrés.
- Déposer le côté plastique de la bande sur le portoir en alignement avec le trait d'application cathodique, dans cette position l'échantillon

N°1 sera du côté gauche au moment de l'application.

- Changer rapidement l'applicateur en abaissant franchement les cavaliers dans les puits contenant les échantillons, répéter trois à quatre fois. La première application doit être appliquée sur un papier buvard, ceci rend la deuxième application plus uniforme.
- Changer à nouveau l'applicateur, comme précédemment et le placer rapidement sur la plaque d'alignement, puis appuyer franchement.
- Disposer rapidement la bande dans le compartiment chambre de migration acétate de cellulose en bas pour assurer un meilleur contact.
- Couvrir d'une lame de verre dans le sens de la largeur.
- Placer le couvercle et attendre une minute avant de démarrer la migration.
- La migration se réalise à un voltage de 350 volts pendant 20 mn, la vérification de l'ampérage est un dispensable.

Elle varie de 5 à 7 μ A par plaque. Si celui-ci est très différent vérifié la tension utilisée ou bien stopper, retirer le courant et vérifier le contact chambre.

- Coloration dès la fin de migration.
- Retirer la prise électrique par mesure de sécurité.
- Prendre la bande et la placer dans le premier bain de coloration qui est le rouge ponceau soit six minutes exactement.

- Décoloration : On décolorera dans 3 bains successifs d'acide acétique à 5%

A intervalle de 5 mn par bain, ce qui fera en tout un temps de 15 mn.

- La déshydratation se fait dans un bain de méthanol pur pendant 5 mn.
- La classification ou encore la transparisation

La bande est placée dans cette solution composée d'un mélange de :

1. Méthanol pur 67 ml
2. Acide acétique pur 29 ml
3. Clair Aid 4 ml

Pendant 5 à 10 mn, retirer la bande, l'égoutter verticalement 1 mn sur papier buvard puis la placer à l'étuve à une température de 50 à 60°C pendant 10 mn jusqu'à la disparition totale de l'odeur de l'acide acétique

- Après le séchage, essuyer parfaitement les deux faces.

Lecture :

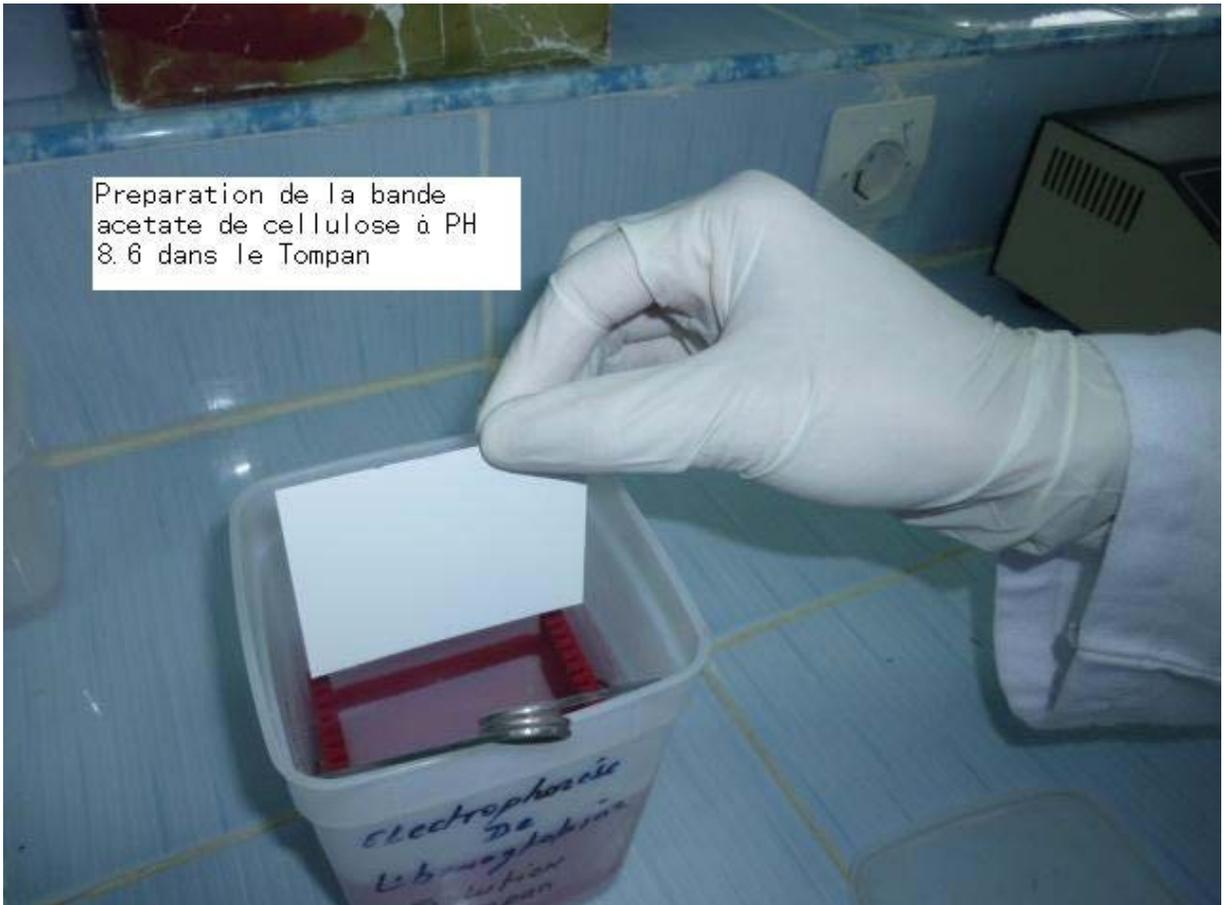
La lecture de la bande acétate de cellulose préalablement colorée se fait sur densimètre photoélectrique à une longueur d'onde de 525 nanomètre, qui permet de mesurer les variations de la qualité de colorants fixés sur la bande tout au long de celle-ci, donc il est impératif de respecter le temps de coloration.

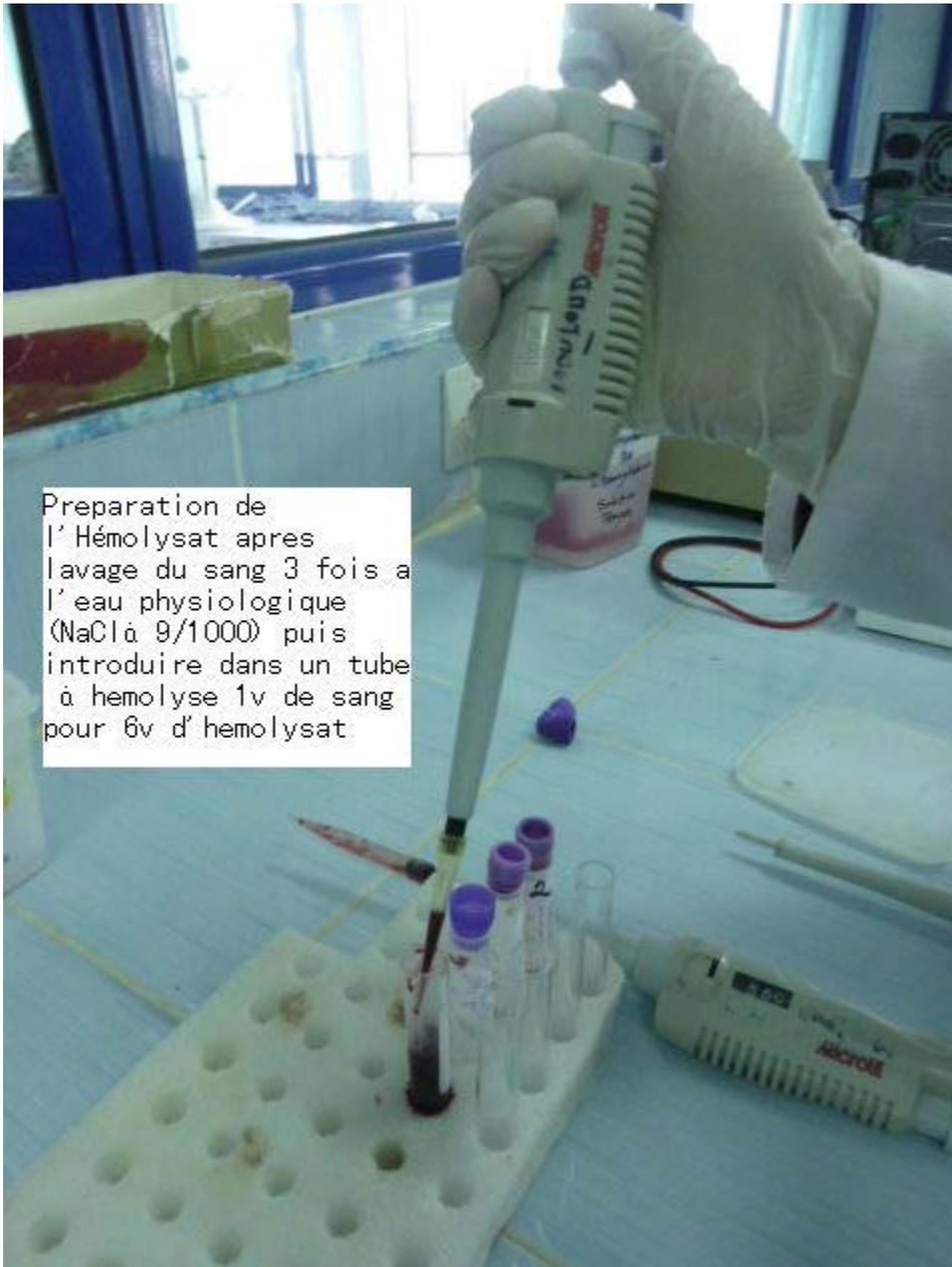
La cellule photoélectrique débite un courant électrique d'intensité proportionnelle aux flux lumineux qui lui parvient.

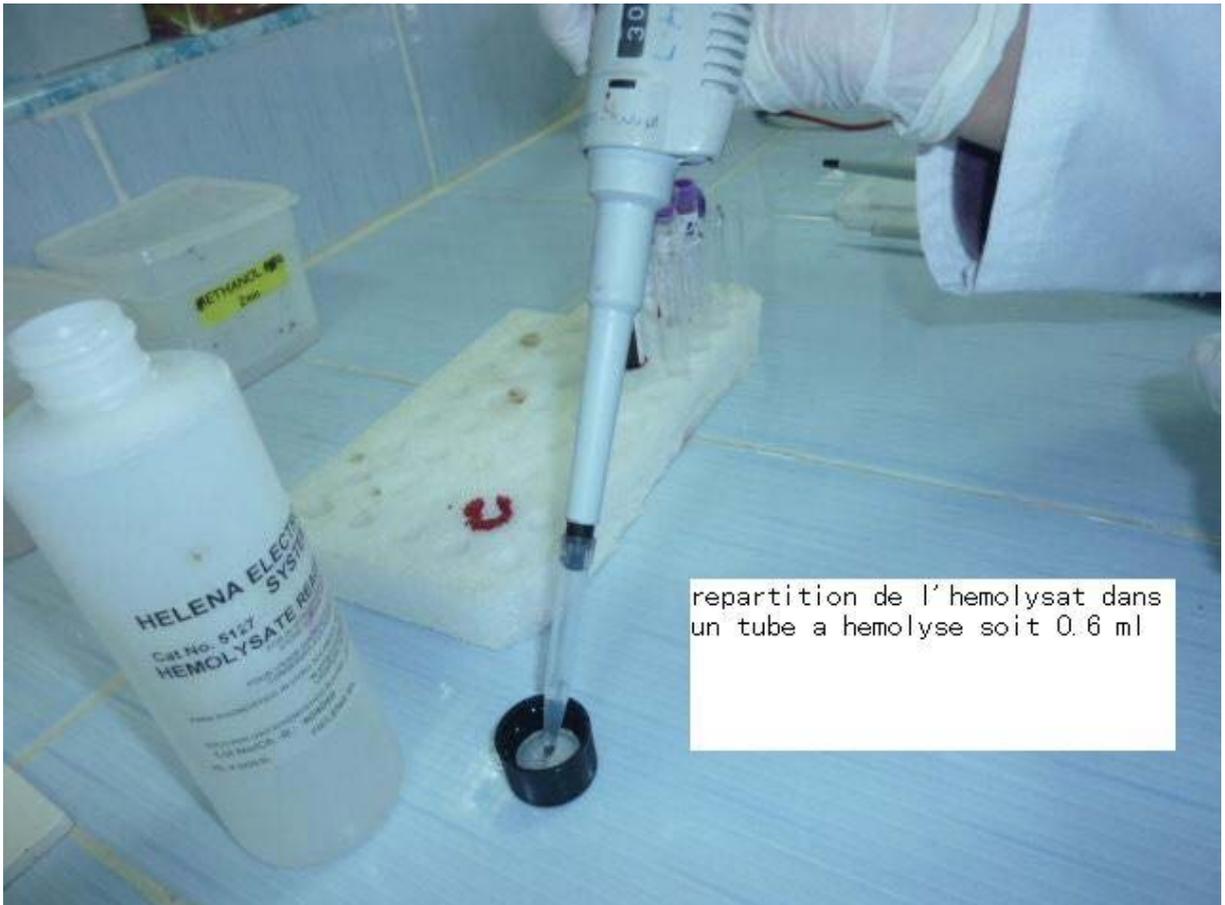
Ce courant est amplifié, analysé et traduit sous forme d'enregistrement graphique, exprimé en pourcentage ou en densité optique (D.O.).

Résultats :

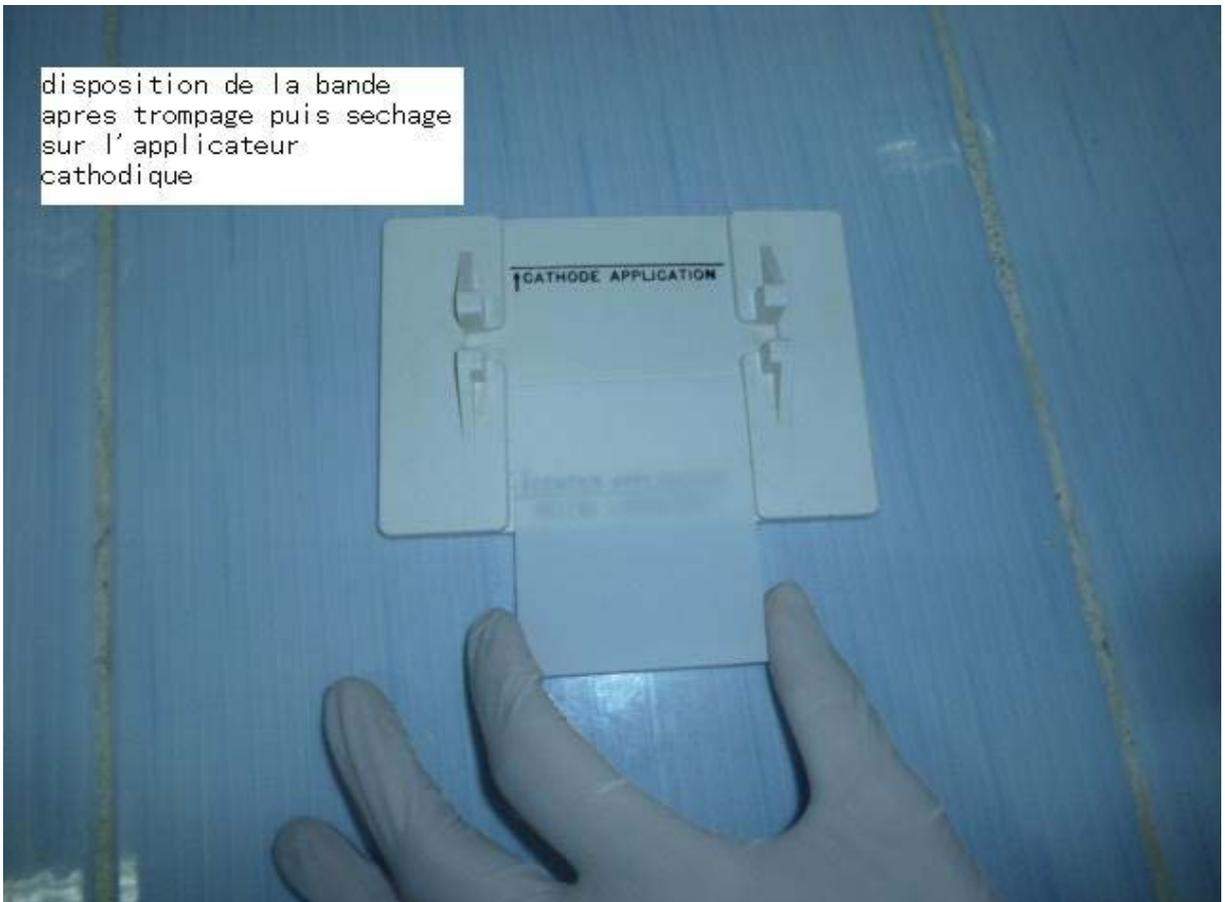
Nous avons étudié les modifications des électrophorèses des hémoglobines et nous avons obtenu les résultats motionnés dans les figures







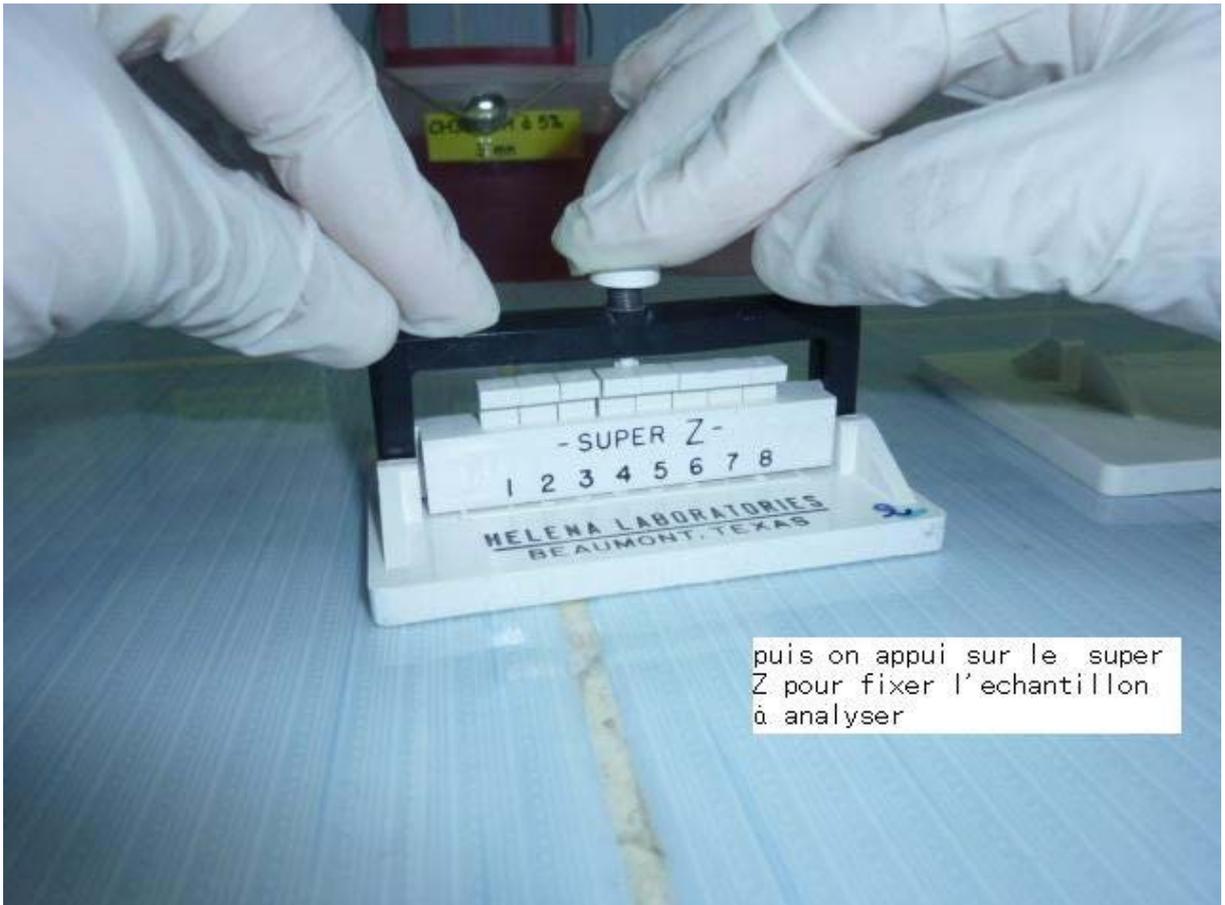


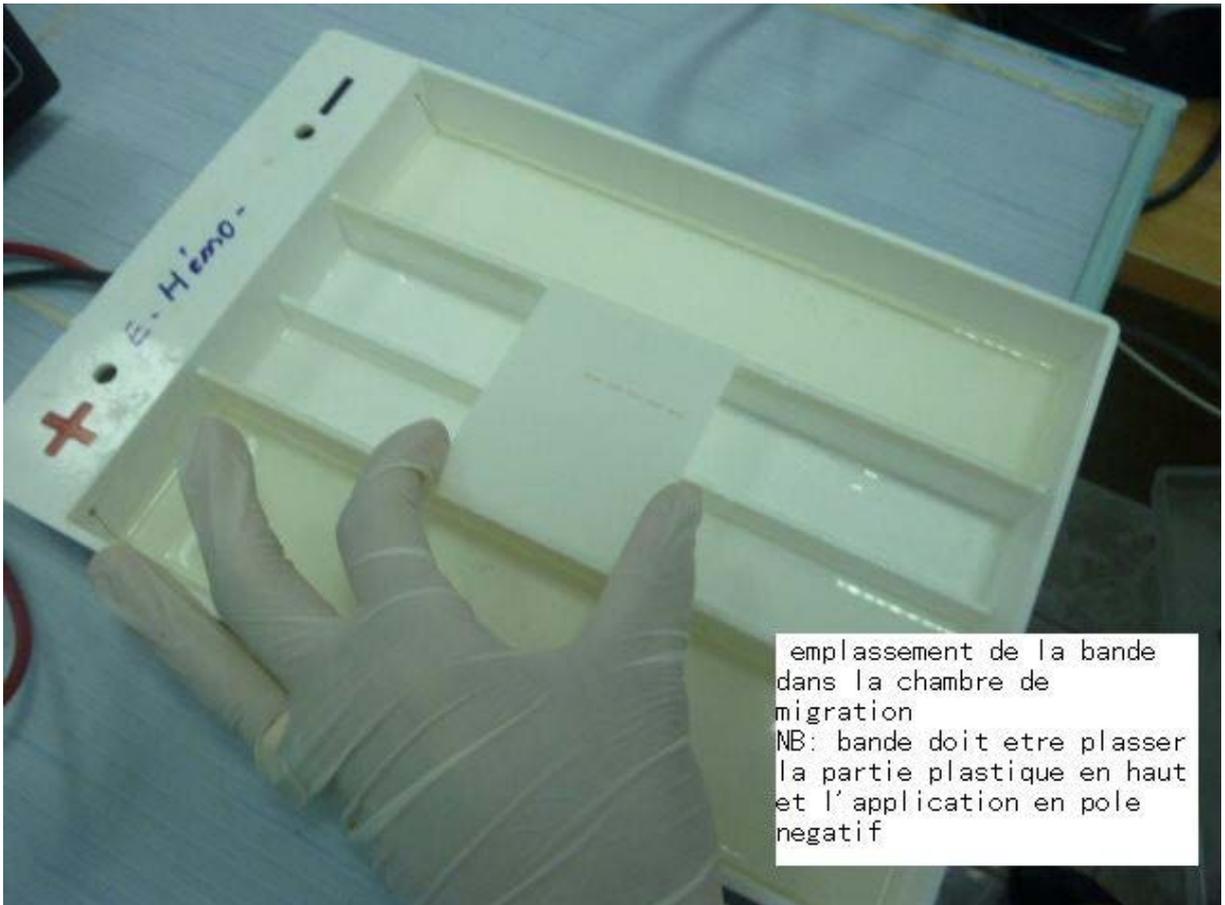


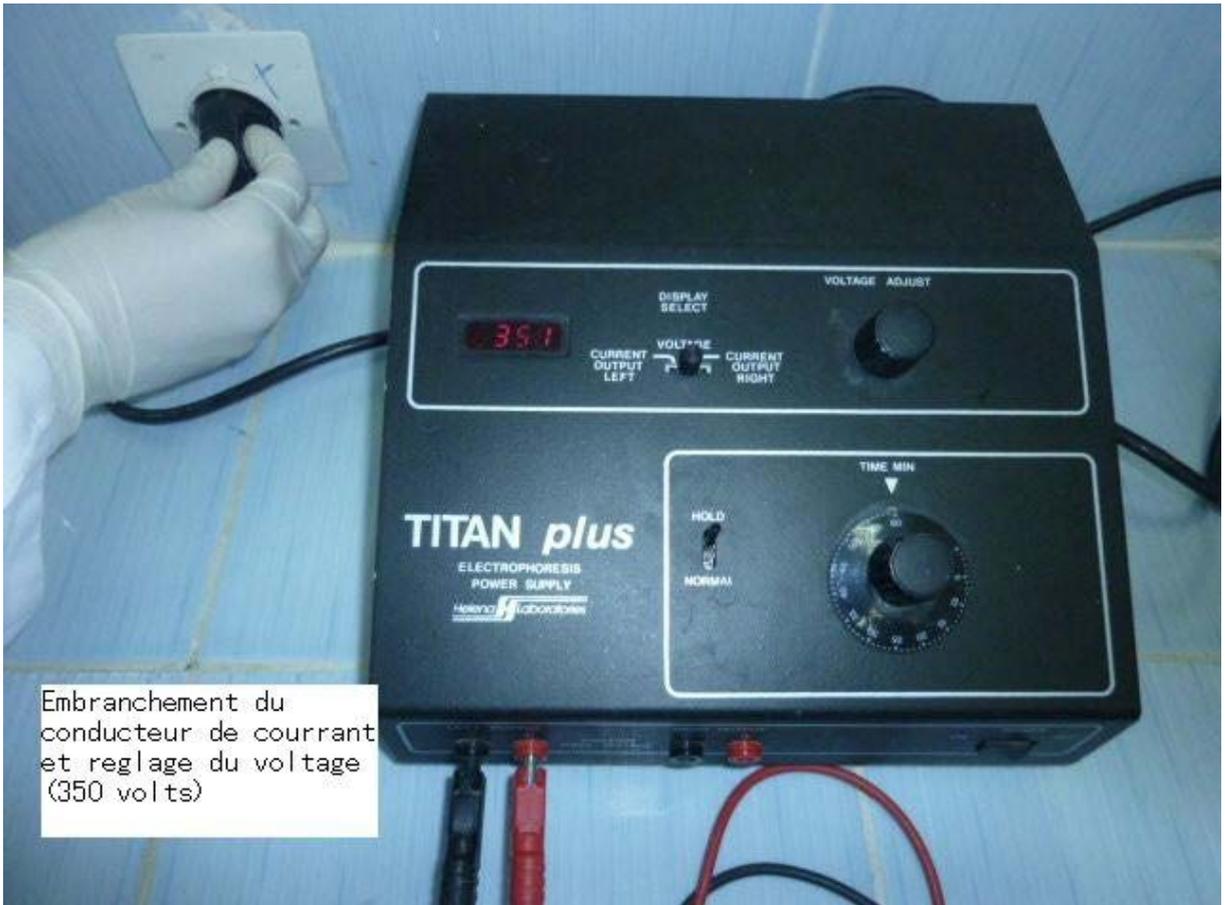
emplacement de la bande
termine



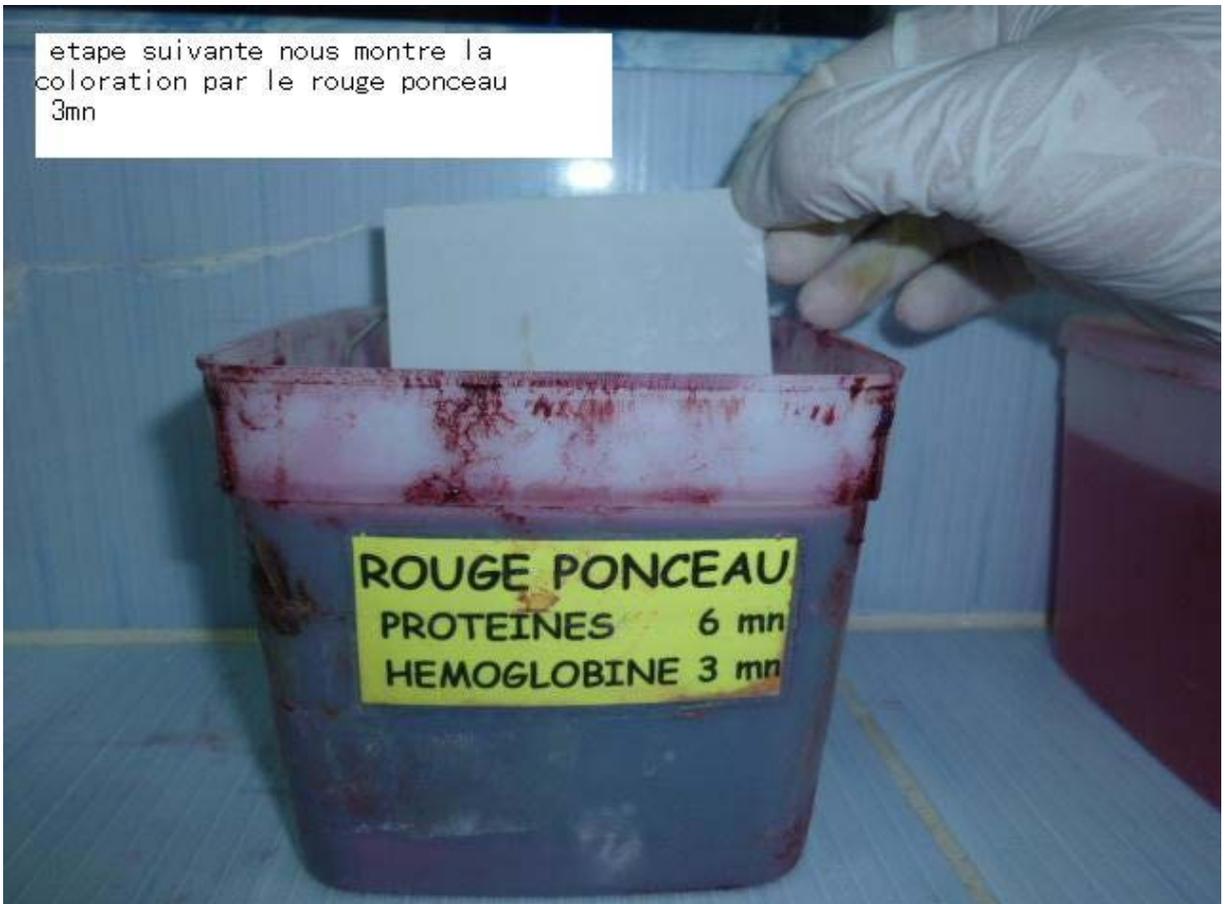
comme on le distingue sur la photo on
plasse le super Z Chaque dent dans
son puit correspondant.







Embranchement du conducteur de courant et réglage du voltage (350 volts)

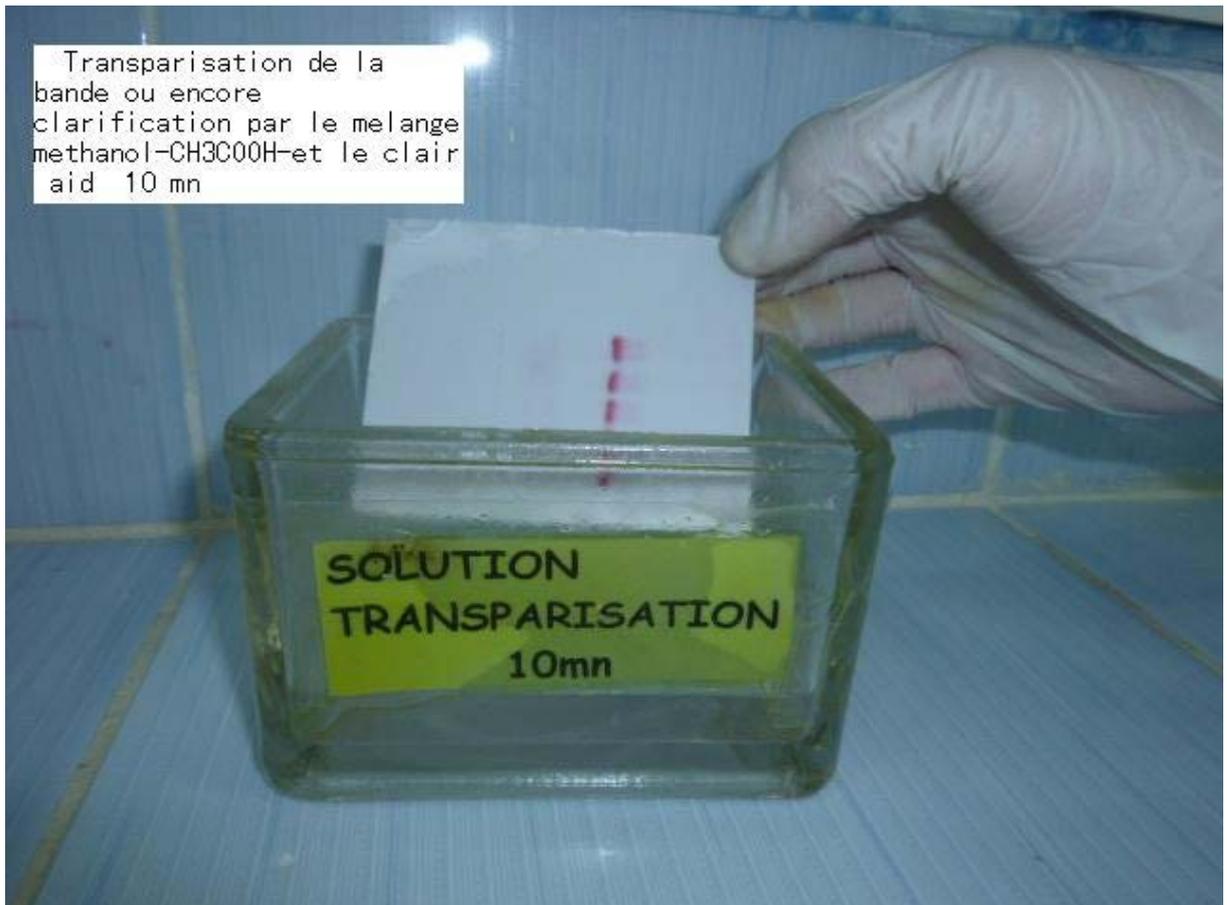


etape suivante nous montre la coloration par le rouge ponceau 3mn





Transparisation de la bande ou encore clarification par le mélange méthanol- CH_3COOH -et le clair aid 10 mn



Présentation des différents bains de coloration

Flacon de
solution
tampon



etuve reglee à
50° C pour sechage
des bandes





Emplacement de la bande dans l'etuve pour sechage jusqu'à disparition total d'odeur du CH₃COOH



Densimetre Helena pour lecture

II-Résultats et discussion :

1-Résultats :

1-1-Résultat d' FNS :

Les normes recommandées par O.M.S (organisation mondiale de la santé) sur les quelles le laboratoire d'analyse se base :

	GR	HCT	HB	PLT	GB
HOMME	4.5→5.5	40→54	13→16	150→450	4→12
FEMME	4→5	37→47	11.5→15	150→450	4→12
ENFANT	3.20→4.80	32→44	9.5→11.5	150→400	8→10

Tableau N°5 : Résultats des différentes analyses effectuées lors de notre stage :

MALADE	SEX	GB	GR	PLT	HB	HCT
1	F	10.3	3.81	139	11.1	31.8
2	H	11.1	4.42	266	13.6	39.8
3	H	36.3	4.15	369	12.1	36.3
4	F	12.1	2.65	469	8.0	24.2
5	F	10.5	4.47	320	12.5	38.2
6	H	7.8	4.91	406	15.4	45.2
7	F	4.8	3.01	221	9.2	27.7
8	F	7.5	4.40	404	13.0	39.9
9	F	10.2	5.10	328	13.2	40.7
10	F	12.5	4.45	439	13.1	38.9
11	H	7.6	4.03	409	10.8	32.8
12	F	7.6	4.25	419	12.4	38.8
13	F	13.0	4.06	280	10.8	33.9
14	F	7.2	3.96	284	12.7	36.2
15	F	11.3	3.94	272	12.1	35.9
16	H	6.4	4.75	383	12.1	36.7
17	F	10.7	4.60	299	13.6	39.6
18	F	5.5	4.98	322	14.4	41.9

Le tableau 3 met en évidence les différents résultats obtenus lors de notre stage pratique au niveau de l'hôpital Meghlaoua Mila, du 18.03 au 22.04.2012.

Il ressort que les patients 1.4.7.14.et 15 présentent une un faible taux de globules rouges mais l'hémoglobine et l'hématocrite concernent seulement les malades 4 et 7 donc d'ou possibilité que ces derniers soit anémiques

1-2-Résultats d'électrophorèse :

Diverses fractions de l'hémoglobine chez les adultes normaux et drépanocytaires.

	Hb A	Hb F	Hb S	Hb A2
Adulte normal	≈ 95	Absence totale	< 1	≈ 3
Drépanocytaire hétérozygote	60 à 75 %	25 à 40 %	< 1	≈ 3
Drépanocytaire homozygote	Absence totale	75 à 90 %	5 a 20 % (variable avec l'âge)	Normal (souvent artefactuellement augmente)

Tableau N°6 : les résultats d'électrophorèse :

	HbA	HbF	HbS	HbA2
1	96%	-	< 1	≈ 3
2	93%	-	< 1	≈ 3
3	96%	-	< 1	≈ 3
4	-	80%	5%	≈ 3
5	95%	-	< 1	≈ 3
6	68%	33%	< 1	≈ 3
7	92%	-	< 1	≈ 3
8	-	83%	7%	≈ 3
9	95%	-	< 1	≈ 3
10	63%	29%	< 1	≈ 3

Les résultats montrent que 06 patients ont des résultats qui concordent avec les normes fixées par l'OMS soit en HbA, HbS, Hb ou HbA2

Cependant, on remarque que 2 malades présentent des signes drépanocytaires hétérozygotes car leurs résultats sont trop inférieurs aux niveaux normaux et se trouvent dans la norme de cette maladie.

Cependant des résultats qui répondent aux normes des drépanocytaires homozygotes soit les malades 4 et 8

2-Discussion générale :

D'après les résultats obtenus nous pouvons dire que la drépanocytose, maladie dangereuse et transmissible d'une génération à l'autre par voie génétique, touche à peu près 40 à 50% des anémiques des deux sexes et de tout âge. Cependant, les patients homozygotes et hétérozygotes présentent des taux égaux malgré que leur importance du point de vue gravité (maladie) n'est pas la même. Il faut noter que cette maladie peut provenir aussi d'une malnutrition à savoir une ration pauvre en fer en particulier. En effet, ce dernier type se rencontre surtout chez les femmes enceintes qui peuvent ainsi transmettre ce manque de fer à l'embryon d'où forte possibilité qu'il soit anémique dès sa naissance.

III-Le traitement :

-Prise en charge spécialisée, multidisciplinaire, idéalement dans un centre de référence de la drépanocytose.

-Information et éducation du patient et de la famille sur :

- *La physiopathologie et les mécanismes des symptômes
- *Les facteurs déclenchant des crises vaso-occlusives et leur prévention
- * Les complications et leur traitement

-Prise en charge à 100% (ALD30)

1-Traitement préventif

-évitement des facteurs déclenchant (antipyrétique précoces si fièvre, hydratation régulière, évitement du froid et des séjours en altitude)

-antibioprophylaxie et vaccination prophylactique, car asplénie fonctionnelle :

- *vaccination anti-pneumococcique
- *vaccination anti-haemophilus
- *oracilline

-supplémentassions en acide folique pour éviter une carence associée a l'hémolyse chronique

-programme transfusionnel au long cours en prévention secondaire après une crise vaso-occlusive grave (CVO), crises douloureuses répétées, défaillance chronique d'organe (insuffisance cardiaque, rénale, respiratoire) : culotes globulaire phénotypes

- exanoguno transfusion préventive : en cas d'intervention chirurgicale programmée. Accouchement.

2-traitement spécifique

-hydroxyurée (hydréa) : en cours d'évolution.

-allogreffe de moelle : en cas de formes sévères.

-conseil génétique dans les populations a risque.

Conclusion :

Après l'étude de la drépanocytose au laboratoire d'analyse de l'hôpital Meghlaoui nous avons remarqué que cette maladie est fréquente dans la région de Mila soit un taux de 40-50% des patients que nous avons eu durant notre stage sont atteints. Les résultats obtenus ont montré que 50% des malades sont hétérozygotes et 50% homozygotes donc elle se trouve dans cette région sous toutes ses formes.

A cet effet nous préconisons que les autorités se penchent sur ce fléau qui prend de plus en plus de l'ampleur, afin de limiter sa propagation. Il est aussi nécessaire de prendre en charge les malades de point de vue soin, entretien traitement, prévention et analyses dans des laboratoires spécialisés avec un personnel qualifié.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

- Atul B .Mehta. victor. A Hoffbrad. (2006). Hématologie. Ed : Cahiers des ECN. Page 143-168
- Lkatin, T Coman (2010). Hématologie. ed masson. P_p 522-523
- Paolo Larizza, Massimo.F Tartelli, Fausto Grignani (2001) .diagnostique des maladies du sang.tom II P_p : 322-327
- Robert Givot, pierre Bégaé, Frédéric Glacteros .La drépanocytose 2003.
- Solonge Liozon. (2010). Pathologie. Ed: wolter Klower France .page 69
- Mélanie Avakian.(2009).La drépanocytose . Page 52
- D.Voet, J.Gvoet. (2010).biochimie. Page 510
- T.R.Harrison.(1193) 5E.Principe de médecine interne : hématologie et oncologie. Ed : flammarion,paris.pp :1543-1546.
- Zimmerman SA , O'branski EE, rosse WF ,Ware RE (1999) hemaglobin S/O(arab) :Thirteen new coses and review of the Literature.Am.j.Hematol.60(04):PP 279-284