

BONNES PRATIQUES DE L 'ETUDE DE L ' HEMOGLOBINE

Josiane BARDAKDJIAN-MICHAU

Groupe de travail hémoglobinopathies

Laboratoire de Biochimie Pr GOOSSENS

Dora BACHIR

Centre de la drépanocytose

CHU HENRI MONDOR 94010 CRETEIL

- **Hémoglobinopathies : maladies génétiques autosomales récessives**
- **Problème de santé publique largement répandu dans le monde**

Que sont les hémoglobinopathies ?

A - Mutation sur une des chaînes de globine

**B - Défaut de synthèse d'une des chaînes de globine
—> Thalassémies**

- Association des 2 types A et B

Exemples de variants de l'hémoglobine

Hb S	Codon 6		
	GAG	→	GTG
	GLU	→	VAL

$\beta^6 \text{ glu} \rightarrow \text{val}$

Hb C	Codon 6		
	GAG	→	AAG
	GLU	→	LYS

$\beta^6 \text{ glu} \rightarrow \text{lys}$

Hb O Arab	Codon 121		
	GAA	→	AAA
	GLU	→	LYS

$\beta^{121} \text{ glu} \rightarrow \text{lys}$

β thalassémies

- Dues à des mutations surtout ponctuelles
 - abolissent ou diminuent la synthèse de la chaîne β
- Plus de 400 mutations identifiées
- En général, une mutation donnée ne se rencontre qu'au sein d'une même population
- La sévérité du désordre est fonction du type de la mutation.

Points d'appel hématologiques et cliniques

- Anémie
- Polyglobulie
- Dépistage néonatal
- Microcytose
- Cyanose
- Hémolyse
- « Ethnie », consanguinité

Situations d'urgence

Quantification de l'Hb S chez un patient connu

- Chirurgie
- Grossesse et accouchement
- Echange ou programme transfusionnel
 - Efficacité
 - Alloimmunisation

Les techniques du diagnostic

- **Isoélectrofocalisation (IEF) Isolab**
- **Electrophorèse en citrate agar pH = 6 pour confirmation**
- **Chromatographie liquide à haute pression (CLHP : Varian BioRad) pour quantification**

Diagnostic biologique

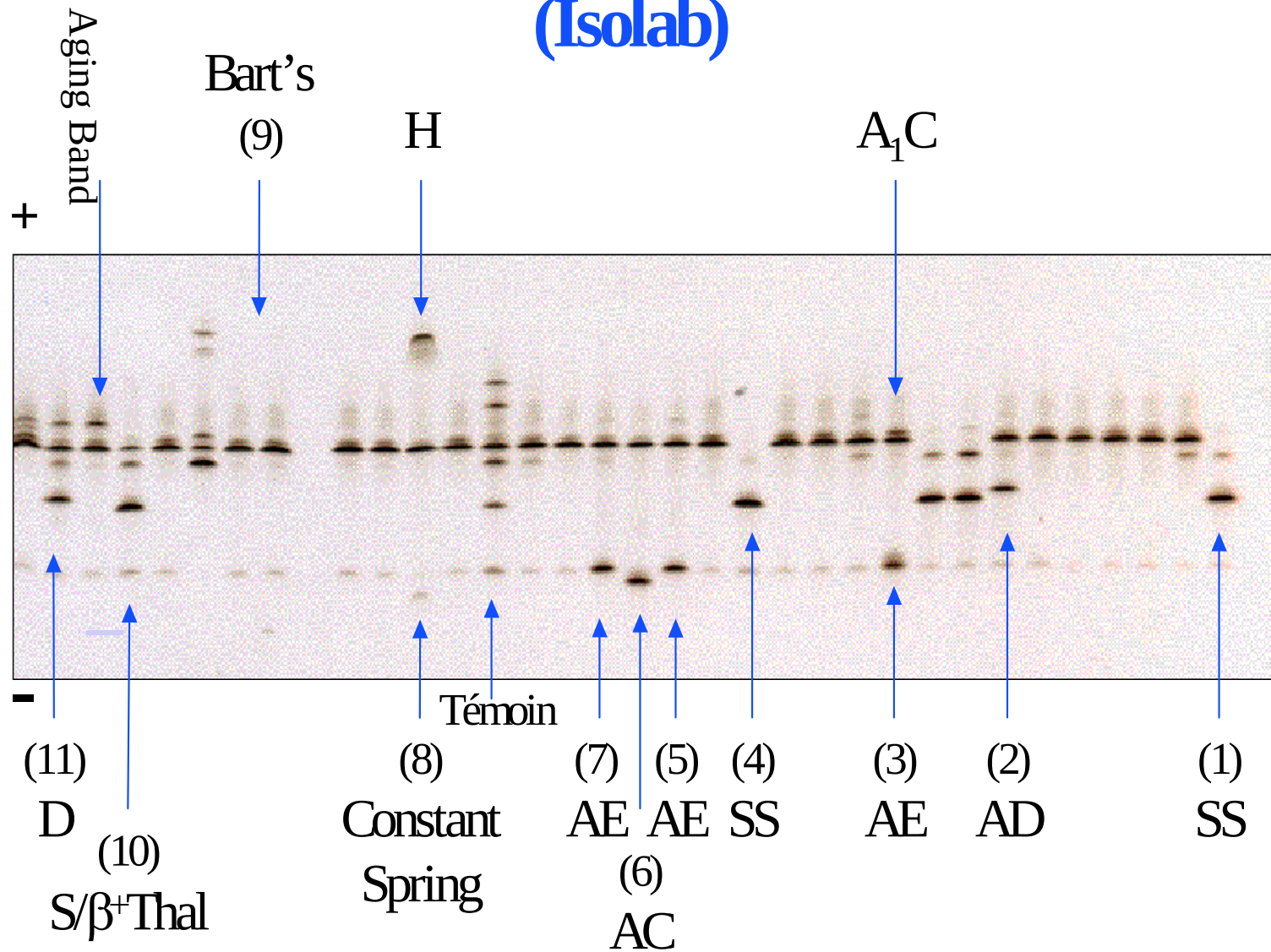
1ère étape : **Isoélectrofocalisation** (IEF) (ISOLAB)

Principe

L'IEF est une technique d'électrophorèse en gradient de pH sous voltage élevé (pH 6 - 8.)

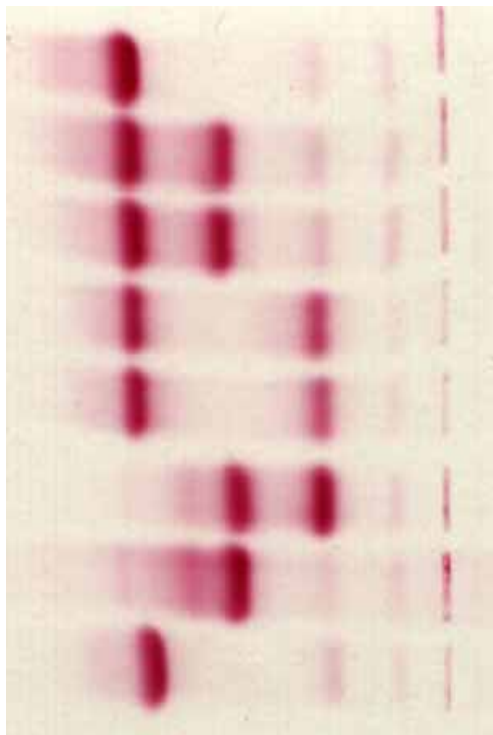
- **L'IEF nécessite une quantité minime de GR**
- **Méthode très sensible (Présence d'Hb S moins de 5 %)**
- **Permet de détecter et de quantifier les Hb anormales S, C, D...**

Isoélectrofocalisation en gel d'Agarose (Isolab)



Electrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin

Hb A₂ déterminée par CLHP



A/A	2,2%
A/S	2,8%
A/D	3,5%
A/C	
A/E	
S/C	
S/D Punjab	
A/β Thal	5,9%

Electrophorèse en Agarose à pH acide

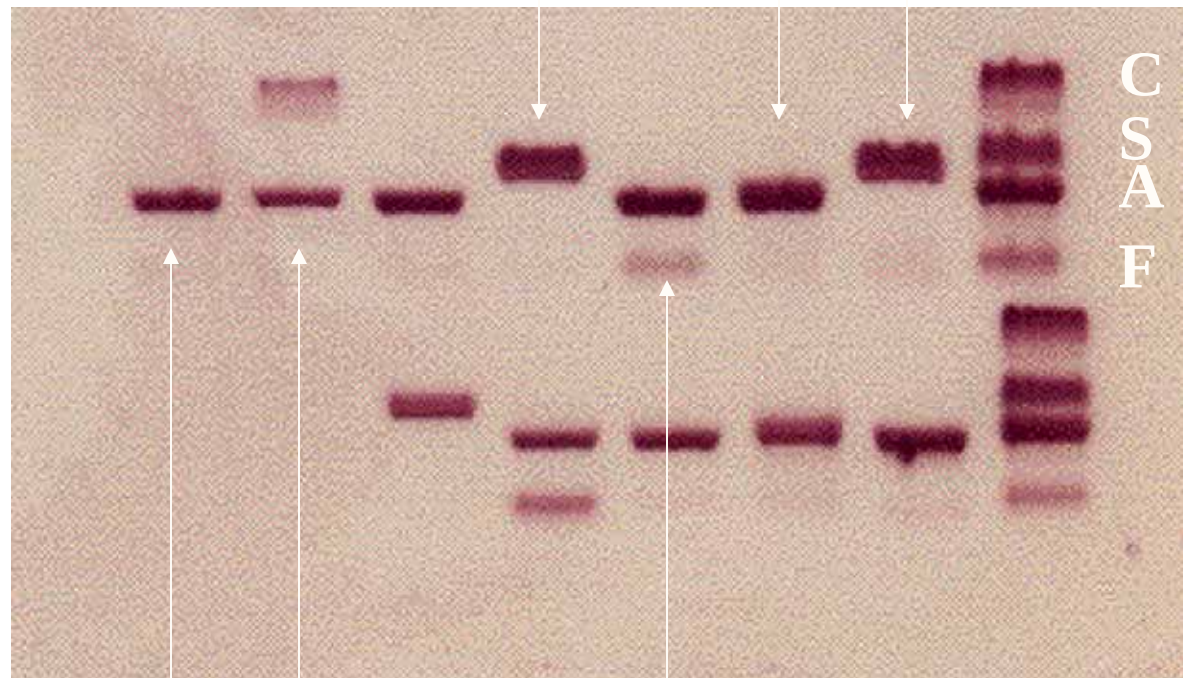
Paragon (Beckman)

2ème étape : Test de confirmation

Dans ce système, la migration résulte de :

- l'électroendosmose —> flux de liquide vers la cathode
- la liaison à l'agaropectine —> complexe migrant vers l'anode.
- l'effet de l'acide maléique (anion) qui entre en compétition avec l'agaropectine pour sa fixation au site du 2.3-DPG et des autres régions chargées positivement de l'hémoglobine.

ELECTROPHORESE CITRATE AGAR



3ème étape : Test de confirmation

Test d'ITANO ou test de solubilité de l'Hb S

La déoxy Hb S polymérise et est insoluble dans une solution déoxygenée de phosphate concentré.

Réduction de l'Hb S par l'action de l'hydrosulfite de Na^+ qui précipite dans une solution tampon P 2.24 M

Test de solubilité pour HbS



1- Témoin normal

2- Présence d 'HbS

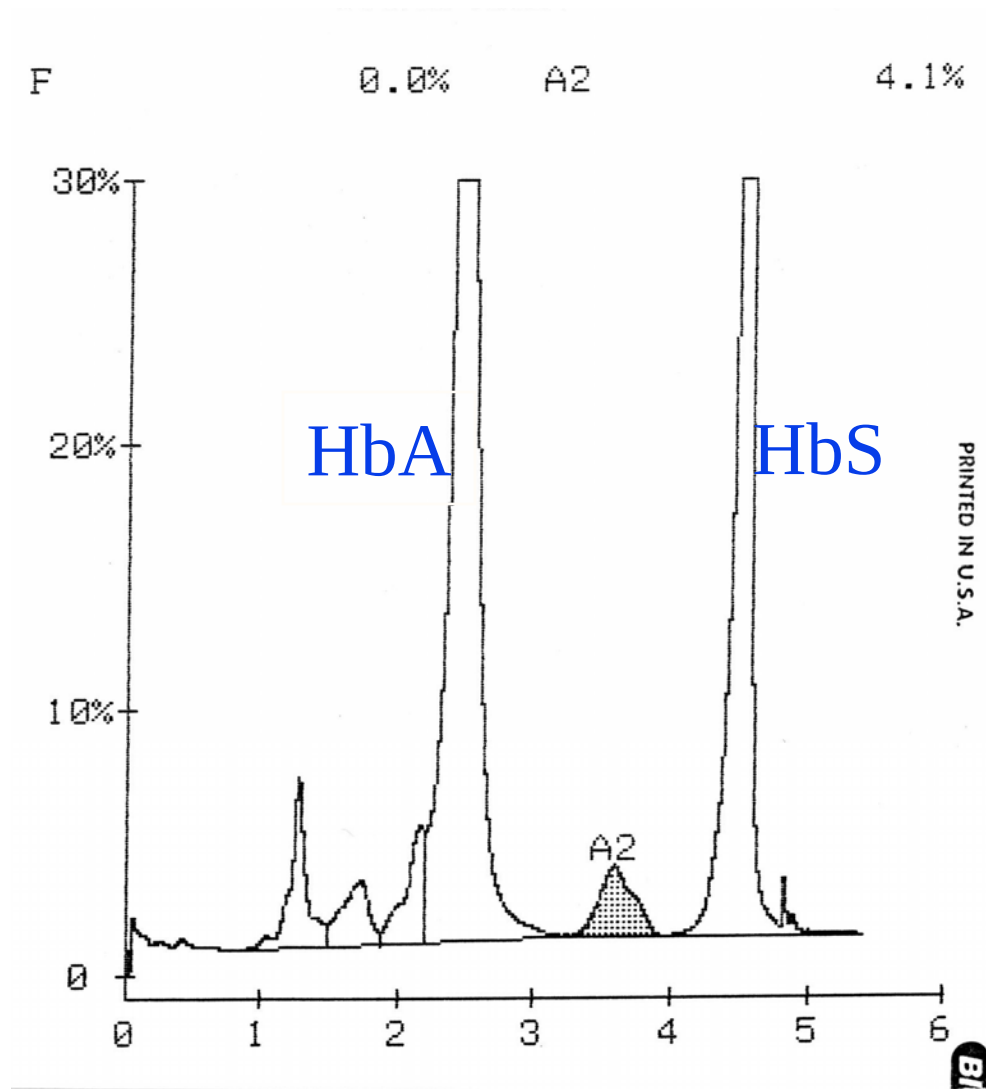
Quantification des fractions d'hémoglobine

**Technique de chromatographie liquide
haute performance**

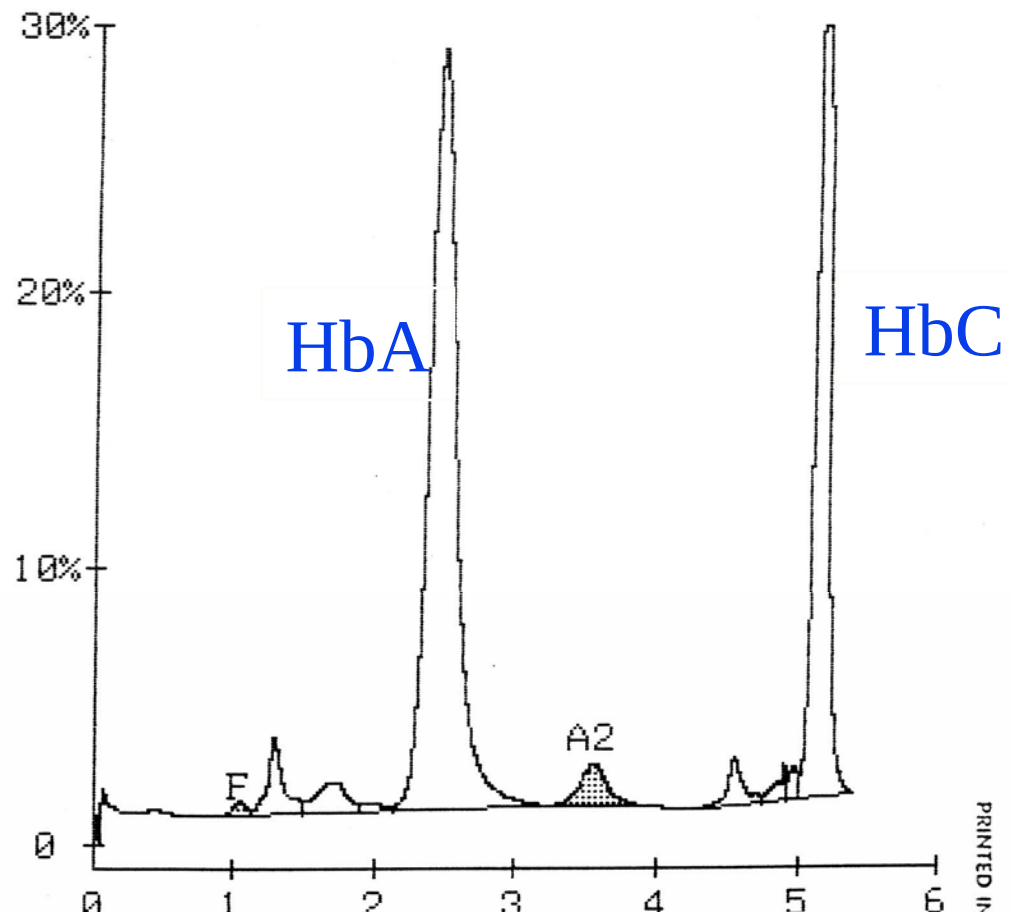
CLHP (variant BioRad).

Résine échangeuse de cations.

Profil CLHP A/S



Profil CLHP A/C



Syndromes drépanocytaires majeurs

S D M

S/S S/D Punjab S/ β^0 thalassémie

S/C S/O Arab S/ β^+ thalassémie

A/S Antilles

RESULTATS

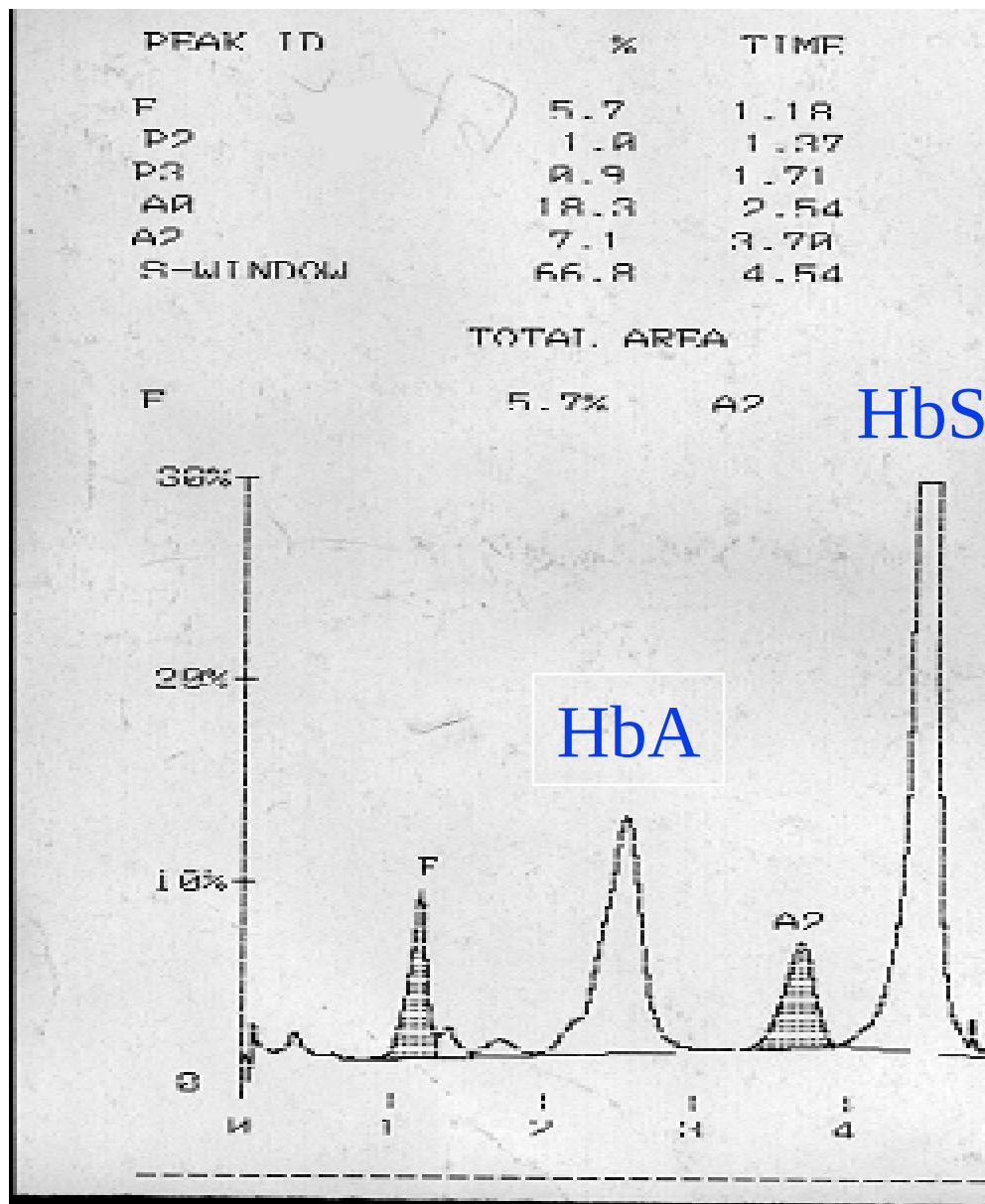
(à interpréter en l'absence de transfusion récente)

- Taux d'Hb S normal pour un hétérozygote

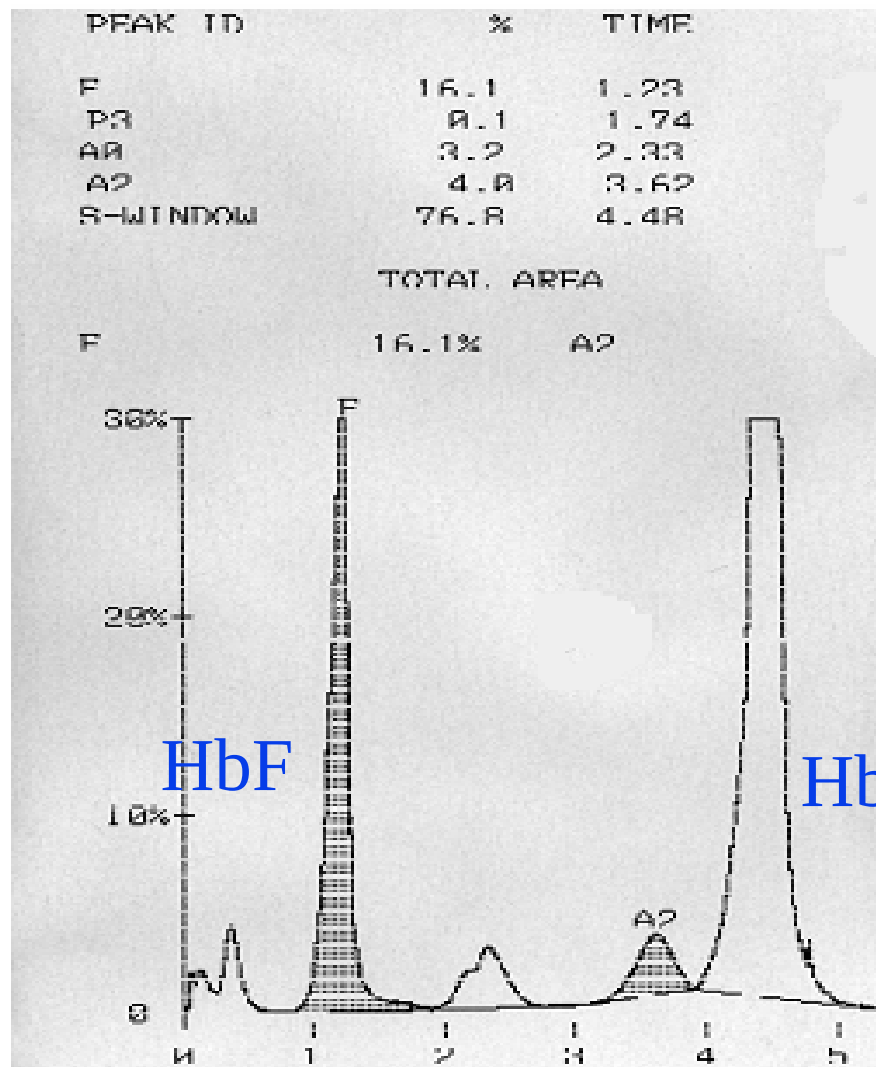
Hb S 35 % à 45 %

- Taux d'**Hb S > 48 %** : anomalie associée probablement à une β^+ thalassémie
- Taux d'**Hb S < 35 %** : anomalie associée probablement à une α thalassémie ou une carence en fer

Dans tous les cas l'étude familiale est nécessaire



$S\beta^+$ thalassémie



SS sous Hydrea

Résultats du dosage de l'Hb A₂

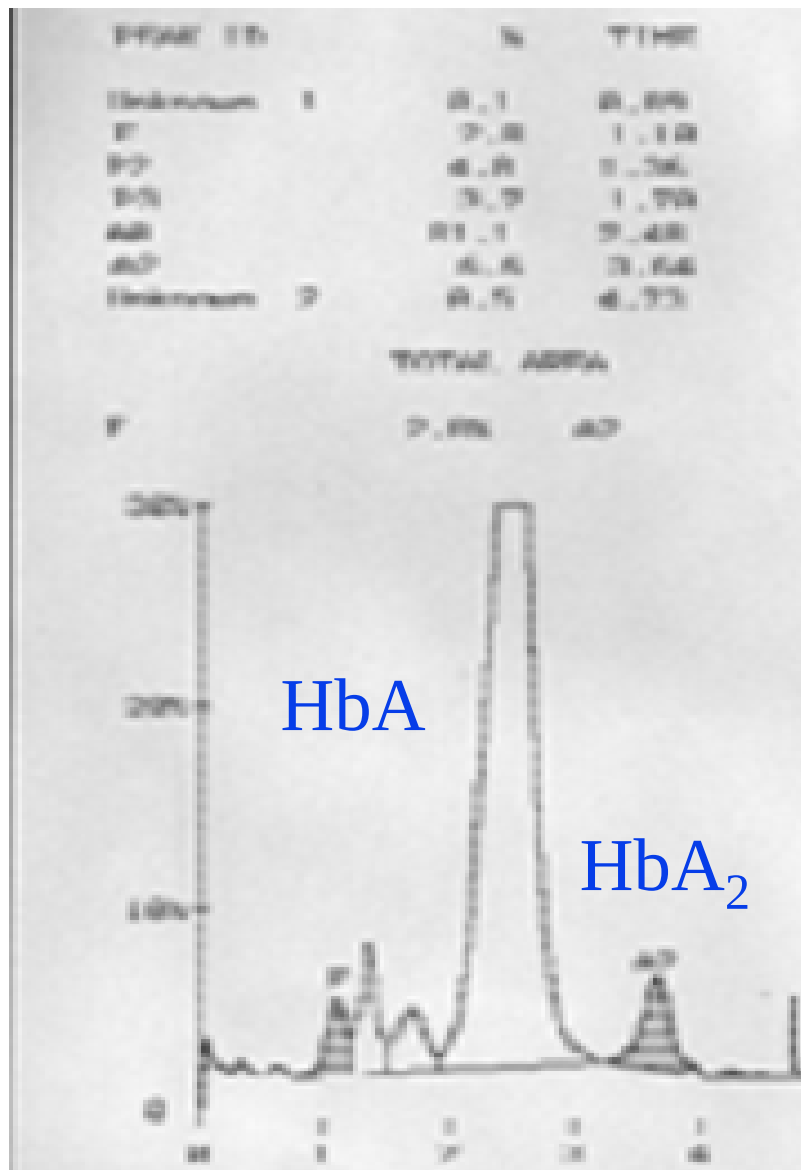
Taux d'Hb A₂ : **Normal et microcytose**

- α Thalassémie probable
- Synthèse des chaînes de l'hémoglobine
- Etude du gène
- Etude familiale

Résultats du dosage de l'Hb A₂

Taux d'Hb A₂ : > 3,1 % et microcytose

- β thalassémie hétérozygote.
- Etude du gène (DPN ?)
- Etude familiale



β thalassémie hétérozygote

Résultats du dosage de l'Hb A₂

Augmentation non génétique de l'Hb A₂

Taux d'Hb A₂ : > 3,1 % sans microcytose

- Hyperthyroïdie non traitée
- Anémies mégaloblastiques
- Patients traités par antiviraux



Recommandations

- Quantification de l'Hb A₂ par densitométrie pas toujours fiable
- Difficile de conclure une étude de l'hémoglobine sans données hématologiques (et ethniques).
- Sans les données cliniques, le diagnostic d' un homozygote SS peut passer pour un hétérozygote AS.
- Un profil S/F ne permet pas de différencier entre un S/PHHF, un S/ β^0 thal. et un S/S → étude familiale ou celle du gène.

REMERCIEMENTS



BONNES PRATIQUES DE L 'ETUDE DE L ' HEMOGLOBINE

Josiane BARDAKDJIAN-MICHAU

Groupe de travail hémoglobinopathies

Laboratoire de Biochimie Pr GOOSSENS

Dora BACHIR

Centre de la drépanocytose

CHU HENRI MONDOR 94010 CRETEIL