

Apport de l'HPLC dans le diagnostic des β thalassémies

S. Oukid, S. Taoussi, M.T. Abad, M. Bradai.

Service Hématologie, EHS ELCC Blida, Algérie



❖ Introduction

Le diagnostic d'hémoglobinopathie repose sur la mise en évidence et la quantification des différentes hémoglobines A (Hb A), A₂ (HbA₂) et foétale (HbF), les variants les plus fréquents étant les hémoglobines S (Hb S), C (Hb C), et E (Hb E).

Les techniques de chromatographie liquide haute performance (**HPLC**) sont actuellement utilisées pour les dosages de l'hémoglobine A₂, d'HbA_{1c} et d'Hb F, avec la possibilité de mise en évidence de différents variants.

❖ Objectifs

Nous présentons les données de 214 cas de β Thalassémies (37.8%) diagnostiqués par HPLC sur 566 manipulations pour suspicion d'anomalies de l'hémoglobine, sur une période de 08 mois.

❖ Historique de l'analyse de l'hémoglobine

* Electrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin :

- C'est une technique manuelle, standard, simple à réaliser sur différents supports d'acétate de cellulose.
- La migration électrophorétique dure 20 minute; elle est suivie d'une coloration et d'une lecture.

- Limites et inconvénients de la technique :

- * Un tracé normal ne signifie pas absence d'hémoglobinopathie :
l'Hb anormale peut présenter la même migration que l'Hb A.
- * Une mauvaise séparation des Hb A et Hb F.
- * Technique longue.

* **Electrophorèse sur agar à pH acide :**

- Elle a un intérêt au niveau des anomalies qualitatives de l'Hb.
- Elle apporte peu d'éléments supplémentaires par rapport au pH alcalin en faveur des syndromes thalassémiques.
- Elle permet de séparer les variants ayant la même mobilité que les Hb A, S, ou C sur acétate de cellulose (les Hb D et G migrent comme l'Hb S sur acétate et au niveau de l'Hb A sur citrate; les Hb C, E, et O Arabe ont la même migration sur acétate).

- **Limite de la technique :**

La mise en évidence de mutants de même mobilité que l'Hb A n'est pas possible .

* Iso-électrofocalisation :

- Utilisation d'un haut voltage permettant de très bien séparer les Hb A, Hb F, Hb D, HB S.
- Une bonne sensibilité car les Hb mineures sont facilement détectées.
- Identification de mutants qui ne sont pas mis en évidence par les autres techniques.
- Nécessite des grandes séries de prélèvements.
- Une technique longue et manuelle.

❖ **Evaluation quantitative des différentes fractions d'Hb**

- **Densitométrie** : l'évaluation du taux de chaque fraction d'Hb est souvent pratiquée directement à partir des tracés électrophorétiques ; elle donne des résultats satisfaisants quand les bandes sont d'intensité moyenne à forte et lorsqu'elles sont nettement séparées les unes des autres ; mais a du mal à discriminer deux bandes proches l'une de l'autre et sous-estimer une bande d'intensité très forte ou très faible ou très focalisée.
- **Dosage Hb A2** : par élution ou par chromatographie échangeuse d'ions.
- **Dosage Hb F : résistance à la dénaturation alcaline.**
- **Test de falciformation**
- **Test de solubilité (test d'Itano)** : pour faire la différence entre Hb S et d'autres variants qui ont la même migration.
- **Test de Kleihauer** : technique cytologique permet de repérer les globules rouges contenant de l'Hb F.

❖ **HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance

➤ **Principe**

Le VARIANT™ II HbA2/HbA1c Dual Program utilise le principe de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) par échange d'ions pour la séparation automatique des hémoglobines normales et anormales et la détermination précise de l'hémoglobine A2, F et A1c dans les échantillons de sang total, sans interférence de la lipémie ou des fluctuations de température.

➤ **Programmes** : deux programmes différents :

✓ Coffret HPLC permet la détermination :

- Hb A2, Hb F et l'identification d'Hb anormales : 500 tests.

- Hémoglobine glyquée Hb A1c : 800 tests.

✓ **Méthodes** :

- **Méthode β -Thal** :

▪ Programme de 6,5 minutes.

▪ Evaluation précise de l'HbA1c en présence d'Hb : A2, F, S, D, E, C.

- **Méthode A1c** :

▪ Programme de 3,5 minutes.

▪ Détermination rapide de l'HbA1c.

Pour passer d'une méthode à l'autre, il n'est pas nécessaire de substituer les tampons et la cartouche, ni de modifier le conditionnement du système.

➤ **Fenêtre des résultats :** selon le temps de rétention de l'Hb

| Durée (min) | Nom du pic | Bande(min) | Fenêtre (min) |
|--------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| 0,22 | A1a | 0,10 | 0,12 - 0,32 |
| 0,26 | A1b | 0,09 | 0,19 - 0,37 |
| 0,48 | F | 0,10 | 0,44 - 0,64 |
| 0,77 | LA1c | 0,07 | 0,68 - 0,82 |
| 0,93 | A1c | 0,10 | 0,86 - 1,06 |
| 1,49 | P3 | 0,10 | 1,45 - 1,6 |
| 1,73 | A0 | 0,15 | 1,6 - 1,9 |
| 2,91 | E | 0,10 | 2,88 - 3,08 |
| 3,45 | S | 0,10 | 3,40 - 3,60 |
| 4,45 | C | 0,10 | 4,40 - 4,60 |

➤ Les temps de rétention des variants

| Nom de l'hémoglobine | Temps de rétention (min) |
|------------------------------------|---------------------------------|
| Hémoglobine Okayama | 0,63 |
| Hémoglobine Geelong | 0,82 |
| Hémoglobine J-Bangkok | 1,62 |
| Hémoglobine D-Iran | 2,67 |
| Hémoglobine Lepore | 2,83 |
| Hémoglobine G-Copenhague | 2,95 |
| Hémoglobine D | 3,21 |
| Hémoglobine Stanleyville II | 3,40 |
| Hémoglobine Manitoba | 3,51 |
| Hémoglobine O-Arab | 4,07 |
| Hémoglobine Hasharon | 4,14 |
| Hémoglobine Agenogi | 4,20 |

❖ **Matériel d'étude**

Sur une période de 08 mois.

✓ Nous avons étudié 566 cas de suspicion d'hémoglobinopathie.

✓ **Echantillons :**

- Les prélèvements de sang total veineux à distance de toute transfusion

- Recueillis sur tubes EDTA

- Stables pendant 7 jours lorsqu'ils sont conservés entre 2 et 8° C.

✓ **Electrophorèse d'hémoglobine a été réalisée en cas :**

- Microcytose associée à une pseudo-polyglobulie.

- Enquête familiale.

✓ **Analyse :**

HPLC VARIANT™ II HbA2/HbA1c Dual Program.

❖ Résultats :

566 cas

Hémoglobines revenues normales dans 255 cas (45%).

| Peak Name | Calibrated Area % | Area % | Retention Time (min) | Peak Area |
|-----------|-------------------|--------|----------------------|-----------|
| Unknown | --- | 0.3 | 0.101 | 1945 |
| A1a | --- | 8.2 | 0.156 | 56606 |
| A1b | --- | 1.3 | 0.268 | 9313 |
| F | 0.9 | --- | 0.476 | 5114 |
| LA1c | --- | 2.2 | 0.736 | 14912 |
| A1c | 5.1 | --- | 1.007 | 21184 |
| P3 | --- | 5.1 | 1.522 | 35232 |
| Ao | --- | 76.7 | 1.771 | 531996 |
| A2 | 2.6 | --- | 2.893 | 17195 |

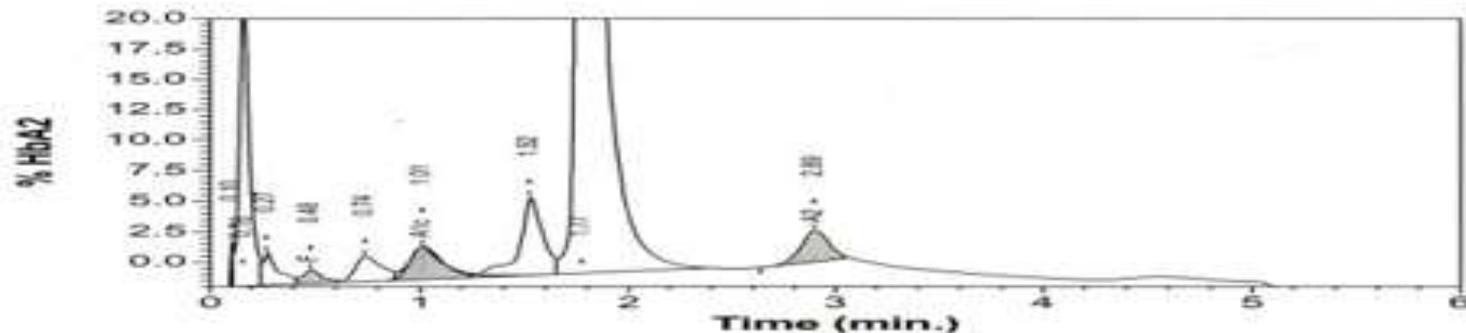
Total Area:

693498*

F Concentration =
A1c Concentration =
A2 Concentration =

0.9 %
5.1 %
2.6 %

Analysis comments:



❖ Résultats :

566 cas

Anomalie d'expression retrouvée dans 311 cas (55%).

| Peak Name | Calibrated Area % | Area % | Retention Time (min) | Peak Area |
|-----------|-------------------|--------|----------------------|-----------|
| Unknown | --- | 0.3 | 0.103 | 5573 |
| A1a | --- | 5.0 | 0.224 | 91668 |
| Unknown | --- | 22.6 | 0.594 | 409982 |
| A1c | 3.0* | --- | 0.943 | 6402 |
| P3 | --- | 0.7 | 1.504 | 12710 |
| Ao | --- | 3.0 | 1.813 | 53923 |
| A2 | 1.9 | --- | 2.883 | 34587 |
| Unknown | --- | 1.8 | 3.121 | 32891 |
| S | --- | 64.3 | 3.387 | 1168529 |

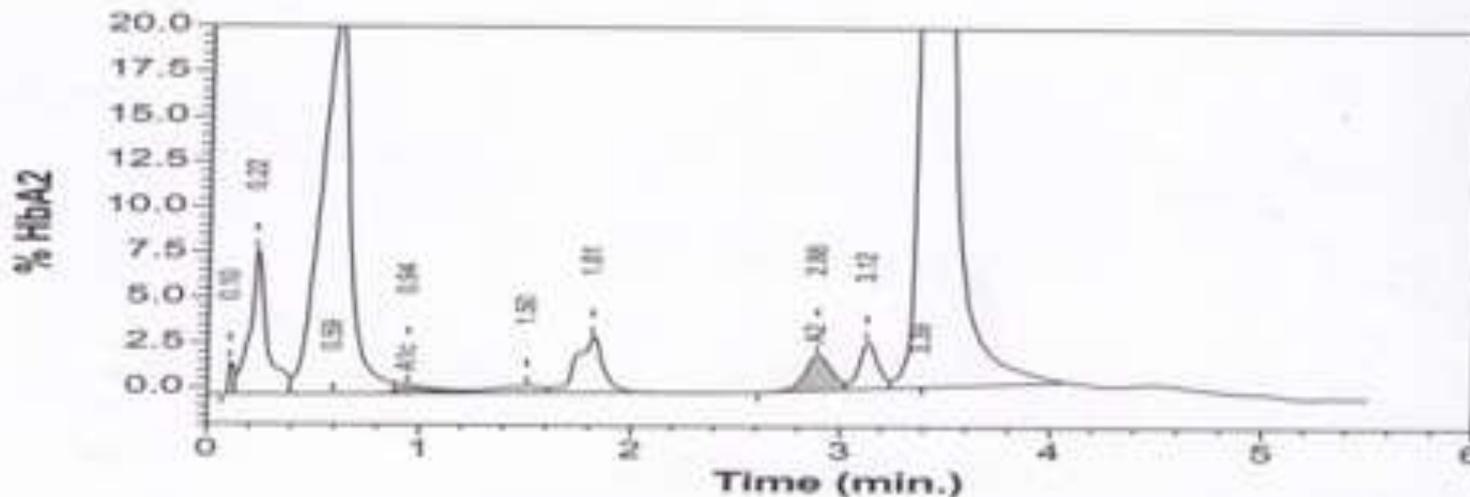
*Values outside of expected ranges

1816245

F Concentration =
A1c Concentration =
A2 Concentration =

%
 3.0* %
 1.9 %

Analysis comments:



➤ Résultats : 311 cas

- ✓ Anomalie de la chaîne Beta dans 214 cas soit 68.8%.
 - **β thalassémie homozygote** : 32 cas (15%).
 - **β Thalassémie hétérozygote** : 182 cas (85%).

B thalassémies homozygotes

❖ **B Thalassémies homozygotes : 32 cas**

*** Sexe :**

- Masculin : 16 cas
- Féminin : 16 cas.

*** Sex ratio : 1.**

*** Taux moyen de l'hémoglobine F : 44,91% (20 - 85).**

❖ Analyse de l'hémoglobine F

➤ **Hb F \geq 50%** : 12 cas (37.5%).

➤ **Hb F $>$ 20%** : 13 cas (40.6%).

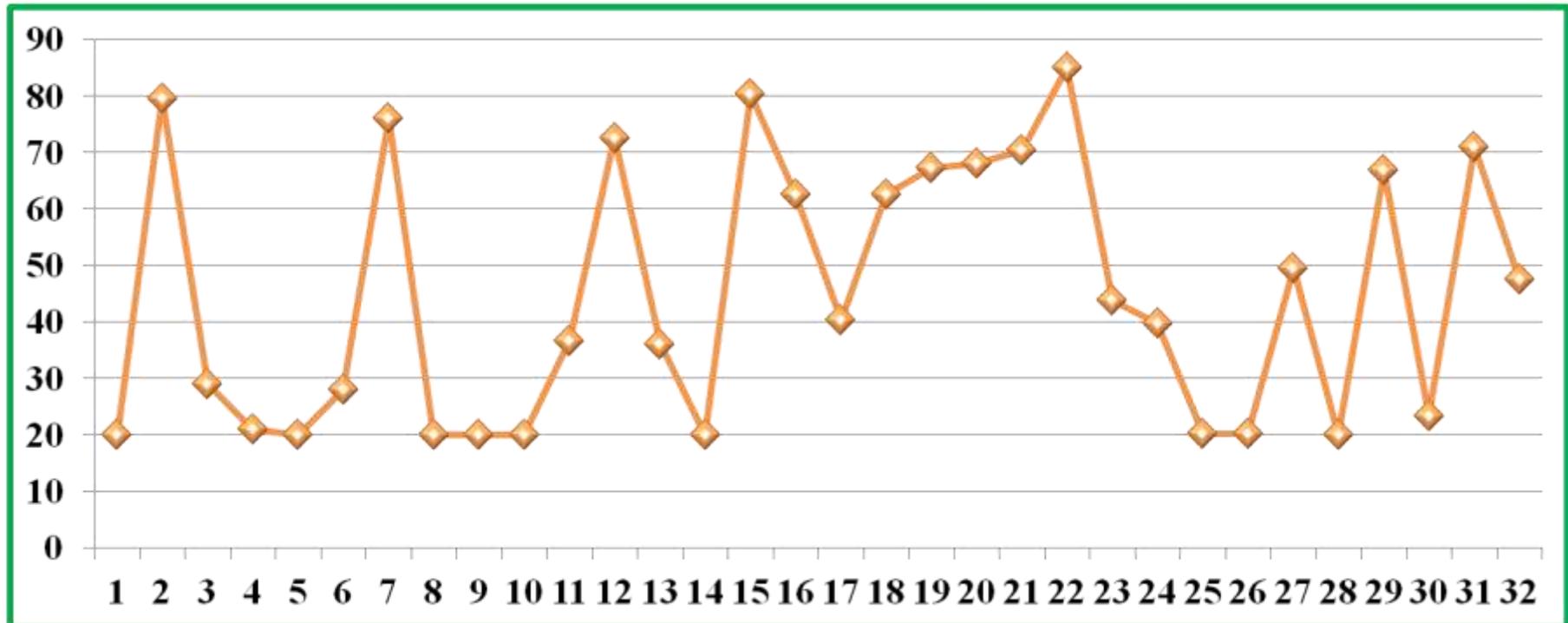


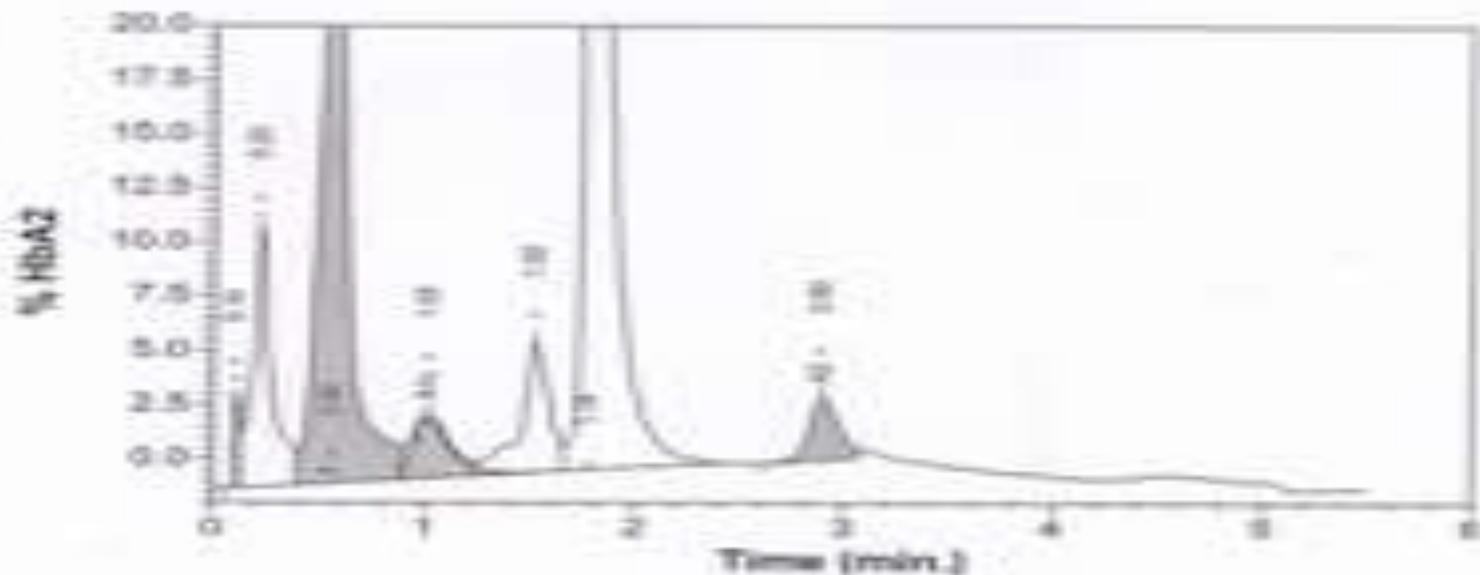
Illustration : B Thalassémie homozygote

| Peak Name | Calibrated Area % | Area % | Retention Time (min) | Peak Area |
|-----------|-------------------|--------|----------------------|-----------|
| Unknown | — | 0.7 | 0.103 | 5959 |
| A1a | — | 7.4 | 0.219 | 65148 |
| F | 28.0* | — | 0.564 | 233455 |
| A1c | 6.9* | — | 1.016 | 29878 |
| P3 | — | 5.7 | 1.520 | 50383 |
| Ap | — | 53.3 | 1.778 | 467224 |
| A2 | 2.9 | — | 2.895 | 24491 |

*Values outside of expected ranges

876537*

F Concentration = 28.0* %
A1c Concentration = 6.9* %
A2 Concentration = 2.9 %

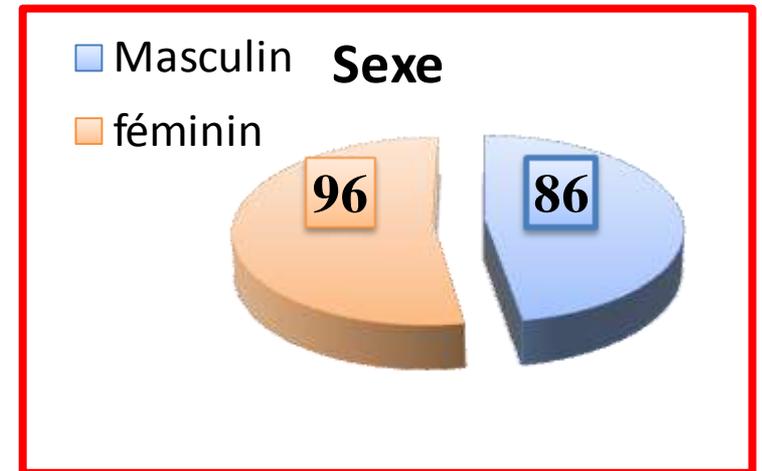


B thalassémies hétérozygotes

❖ B Thal hétérozygote

182 cas

- * **Sexe :**
 - Masculin : 86 cas.
 - Féminin : 96 cas.



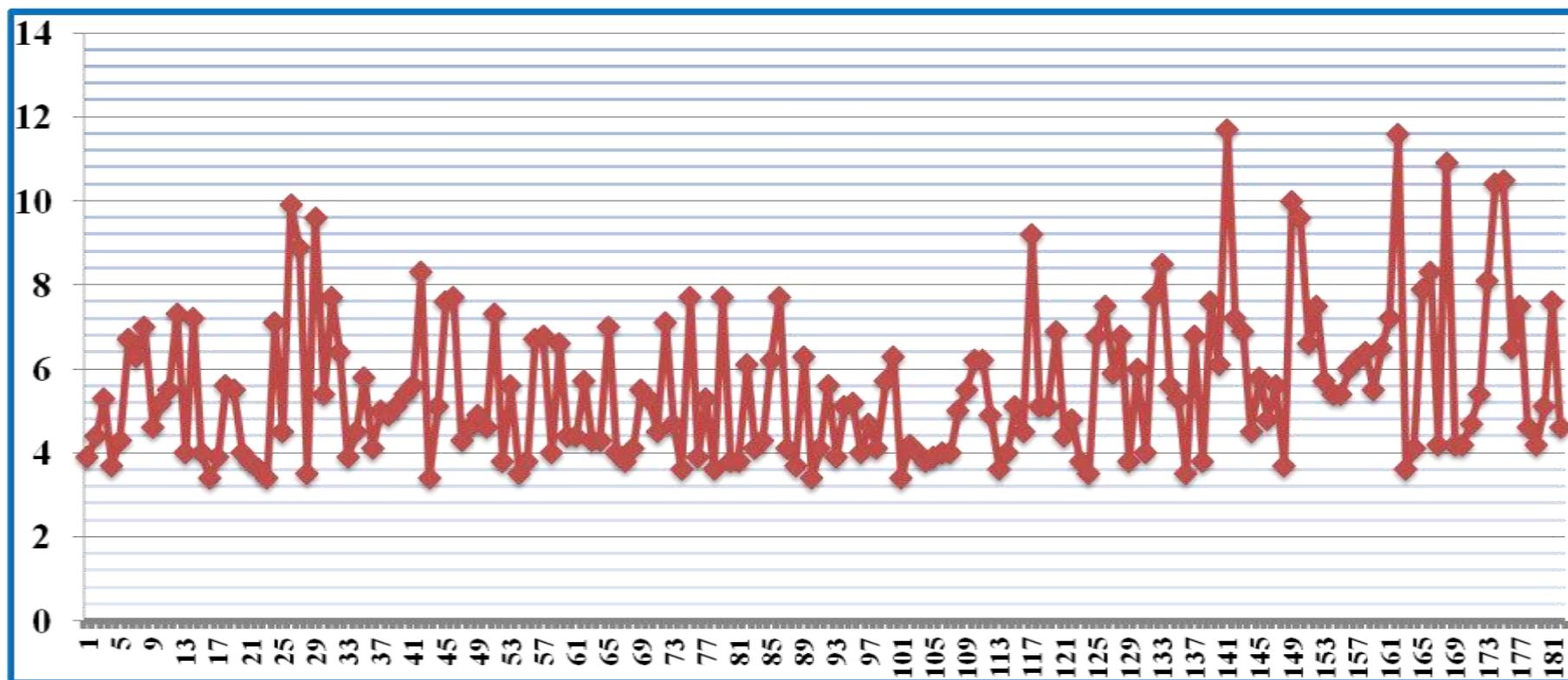
- * **Sex ratio** (M/F) = 0.89.

- * **Taux moyen d'hémoglobine A2** = 5,54% (3,4 - 11,7).

❖ Analyse de l'hémoglobine A2

182 cas

Hémoglobine A2 : 5,54% (3,4 – 11,7)



❖ Analyse de l'hémoglobine A2

- Taux d'hémoglobine A2 \geq à 5% : 99 cas (54,4%).
- Taux d'hémoglobine A2 entre 4 à 4,9% : 50 cas (17,4%).
- Taux d'hémoglobine A2 entre 3,4 à 3,7% : 17 cas (9,4%).

- Diagnostic retenu devant :

- Persistance de la pseudoglobulie et de l'anémie microcytaire.
- Existence de cas similaire dans la famille.
- L'un des deux parents est porteur d'un trait de β thalassémie.

Après plusieurs contrôles, nous avons retenu le diagnostic de β thalassémie hétérozygote.

Illustration : B Thal hétérozygote

| Peak Name | Calibrated Area % | Area % | Retention Time (min) | Peak Area |
|-----------|-------------------|--------|----------------------|-----------|
| Unknown | --- | 0.2 | 0.103 | 2770 |
| Unknown | --- | 0.6 | 0.171 | 8251 |
| A1a | --- | 0.7 | 0.212 | 8671 |
| A1b | --- | 0.8 | 0.273 | 11235 |
| F | 1.7 | --- | 0.496 | 28920 |
| LA1c | --- | 0.8 | 0.769 | 11026 |
| A1c | 4.8 | --- | 1.018 | 27576 |
| P3 | --- | 4.3 | 1.531 | 56881 |
| Ao | --- | 81.0 | 1.748 | 1073896 |
| A2 | 8.3* | --- | 2.896 | 96480 |

*Values outside of expected ranges

1325706*

F Concentration = 1.7 %
A1c Concentration = 4.8 %
A2 Concentration = 8.3* %

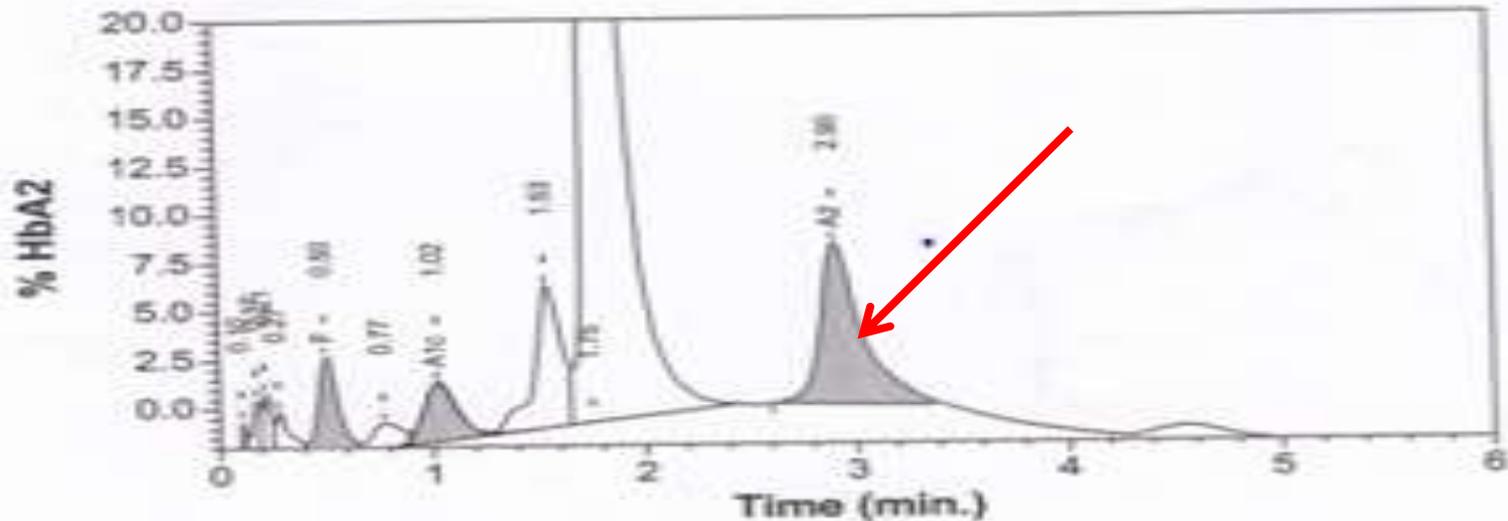


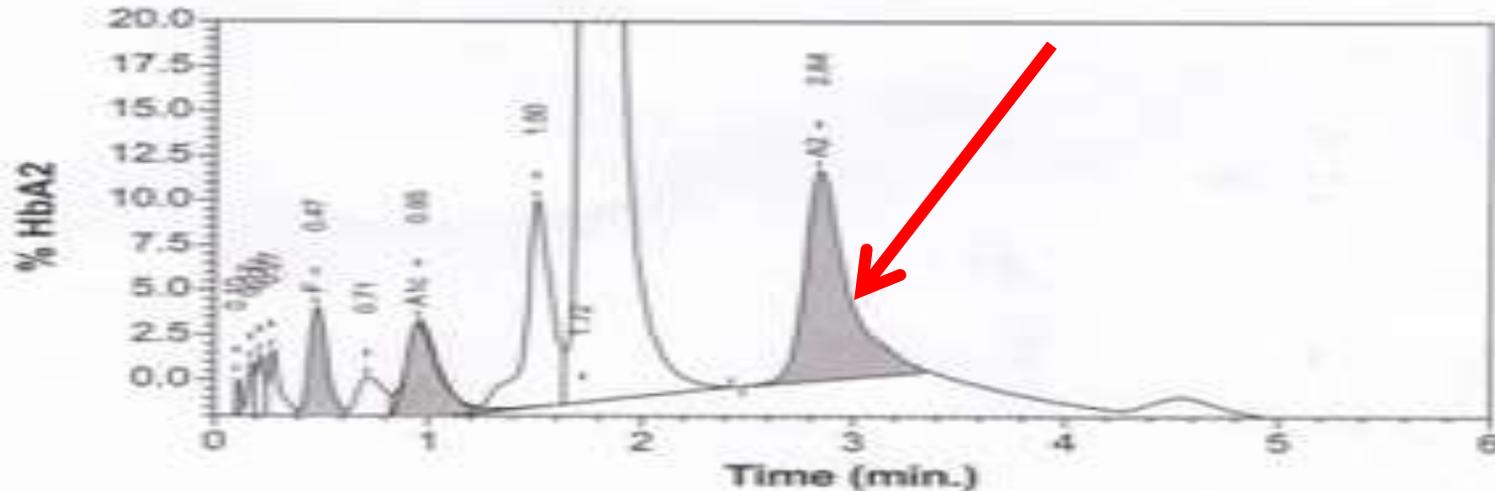
Illustration : B Thal hétérozygote

| Peak Name | Calibrated Area % | Area % | Retention Time (min) | Peak Area |
|-----------|-------------------|--------|----------------------|-----------|
| Unknown | --- | 0.2 | 0.103 | 3594 |
| Unknown | --- | 0.5 | 0.170 | 9036 |
| A1a | --- | 0.5 | 0.211 | 8757 |
| A1b | --- | 0.9 | 0.265 | 16119 |
| F | 1.5 | --- | 0.474 | 33815 |
| Unknown | --- | 1.0 | 0.713 | 18579 |
| A1c | 5.1 | --- | 0.952 | 43974 |
| P3 | --- | 4.2 | 1.499 | 75271 |
| Ao | --- | 81.2 | 1.725 | 1443495 |
| A2 | 11.7* | --- | 2.837 | 125397 |

*Values outside of expected ranges

1778036

F Concentration = 1.5 %
A1c Concentration = 5.1 %
A2 Concentration = 11.7* %



Commentaires : Analyse de l'hémoglobine par HPLC

- ✓ Entièrement automatisée.
- ✓ Grande sensibilité.
- ✓ Rapidité d'analyse (< 08 min) et de rendu des résultats .
- ✓ Quantification précise des différentes hémoglobines normales et des variants.
- ✓ Surveillance du taux d'Hb F des patients sous Hydroxurée.
- ✓ Dosage de l'Hb F en cas SMD et Aplasie médullaire.

Commentaires : Analyse de l'hémoglobine par HPLC

- ✓ Procédure très intéressante pour le dépistage, les enquêtes familiales et les études épidémiologiques.

En 2006, une étude algérienne sur 1000 couples mariés a permis d'estimer la prévalence de la thalassémie hétérozygote à 2%. (2).

Application de la loi de Hardy-Weinberg à ces résultats a estimé que le nombre de naissances d'enfants homozygotes serait de 1/10000 naissance. (3).

Conclusion

L'HPLC est un outil remarquable pour l'étude des hémoglobinopathies.

La rapidité et la sensibilité caractérisent cette méthodologie.

Elle est un examen clé dans le diagnostic des formes hétérozygotes.

Normalement elle doit être pratiquée de façon systématique dans le bilan prénuptial.

Plusieurs autres méthodes sont en cours de développement dont l'électrophorèse capillaire : les résultats de la méthode développée par Mario sont en excellent accord avec ceux de l'HPLC, donc cette dernière méthode reste un excellent moyen de diagnostic des différentes portions de l'hémoglobine même à faible concentration. (1).

Références

- 1- F. Cotton , F. Vertongen, B. Gulbis.** Électrophorèse capillaire et hémoglobinopathies
Immuno-analyse & Biologie spécialisée 21 (2006) 45 - 50.
- 2- S. Nekkai.** Prévalence de la β thalassémie hétérozygote chez les couples mariées en 2006 dans la wilaya d'Alger. Thèse de DESM Alger 2007.
- 3- M. Belhani.** Epidémiologie de la β thalassémie homozygote en Algérie. Revue Algérienne d'Hématologie; N°1, sept 2009. 22- 26.