

## ELECTROPHORESE DE L'HEMOGLOBINE

### Recherche d'une anomalie de l'hémoglobine

#### DEFINITION

L'hémoglobine (Hb) est un hétéro-tétramère constitué de deux types de sous-unités protéiques de structure voisine ; chaque sous-unité est liée à une molécule d'hème constituée par une protoporphyrine ayant en son centre un atome de fer capable de fixer une molécule d'oxygène.

Les anomalies de l'hémoglobine sont des pathologies génétiquement déterminées qui constituent, pour un certain nombre d'entre elles, un problème de santé publique dans de vastes parties du monde. Ces anomalies se répartissent en deux grands groupes :

- les anomalies de structure des chaînes protéiques de globine, comme les hémoglobines S, C et E, parmi les plus fréquentes ; plus de 900 variants de l'hémoglobine sont actuellement répertoriés.
- les anomalies de synthèse des chaînes de globine, responsables des thalassémies et des persistances héréditaires de l'hémoglobine fœtale (PHHF).

#### BIOPATHOLOGIE

##### ■ LES HEMOGLOBINES ANORMALES

L'hémoglobinopathie la plus fréquente et la plus grave est la drépanocytose. Elle résulte, le plus souvent, d'une mutation ponctuelle à l'état homozygote sur la chaîne bêta-globine, à l'origine de l'Hb S : [bêta6 (A3) GAG>GTG Glu>Val]. Cette hémoglobinopathie touche les populations noires d'Afrique, des Antilles et des Etats Unis ; la drépanocytose est aussi la première maladie génétique en France. La modification structurale de l'Hb S favorise la polymérisation de sa forme désoxygénée ; les polymères fibreux induisent la déformation du globule rouge en faucille : la falciformation, déclenchée par la désoxygénation, la déshydratation, la fièvre et l'acidose, est responsable de l'anémie normochrome, normocytaire, souvent bien tolérée, et des crises vaso-occlusives douloureuses. Les patients drépanocytaires présentent aussi une susceptibilité particulière aux infections.

L'association d'une Hb S à l'état hétérozygote à une autre hémoglobinopathie peut également être responsable d'un syndrome drépanocytaire majeur. Cela peut être l'Hb D-Punjab [ 121(GH4) Glu > Gln] ou l'Hb O-Arab [ 121(GH4) Glu > Lys] qui stabilisent le polymère d'Hb S, ou l'Hb C [ 6(A3) Glu > Lys] qui favorise la déshydratation de l'hématie et augmente sa concentration en Hb S.

Les hémoglobines S, C, D-Punjab, O-arab, à l'état hétérozygote, ne sont responsables d'aucune anomalie

biologique, ni clinique. L'Hb E à l'état hétérozygote, très fréquente chez les populations asiatiques, est à l'origine d'une anémie microcytaire.

##### ■ LES THALASSEMIES

Les thalassémies résultent d'un déficit partiel ou total de synthèse d'une ou de plusieurs chaînes de globine : ce sont les alpha- et les bêta-thalassémies, mais aussi les delta-, gamma-, delta-bêta-thalassémies.

Les alpha-thalassémies sont répandues dans les populations autour du bassin méditerranéen en Afrique, au Moyen-Orient et en Asie du Sud-Est. Elles résultent de délétions (le plus souvent) ou de mutations ponctuelles (plus rarement) d'un ou plusieurs des quatre gènes alpha-globine. Trois états cliniques de gravité croissante peuvent être observés : la thalassémie alpha-plus et le trait thalassémique alpha (1 ou 2 gènes alpha atteints, se traduisant par une hypochromie ou une microcytose), l'hémoglobinose H (trois allèles inactifs ou absents), caractérisée par une fraction labile d'Hb H et une anémie hémolytique chronique, et l'hémoglobinose de Bart (quatre allèles inactifs ou absents), qui se manifeste par un décès *in utero* entre le 5<sup>ème</sup> mois de grossesse et la naissance dans un tableau d'anasarque anémique (*hydrops fetalis*) avec une morbidité maternelle importante.

Les bêta-thalassémies se rencontrent dans les populations du pourtour méditerranéen et du Moyen-Orient. Ce sont les thalassémies les plus rencontrées en France. Trois types de bêta-thalassémie sont décrits : la bêta-thalassémie mineure ou trait thalassémique (cliniquement asymptomatique mais associée à une microcytose, une hypochromie, une pseudopolyglobulie), la bêta-thalassémie majeure (forme homozygote caractérisée par une anémie microcytaire hypochrome liée à la dysérythropoïèse et à l'hémolyse, requérant des transfusions de concentrés globulaires et un traitement chélateur du fer, se traduisant par une hépatosplénomégalie et un retard staturo-pondéral), la bêta-thalassémie intermédiaire (regroupant des formes homozygotes ou hétérozygotes composites), se manifestant par une anémie de degré variable, avec des besoins transfusionnels occasionnels ou absents, un hypersplénisme, une lithiase biliaire, des foyers d'hématopoïèse extra-médullaire, des complications thrombotiques et une surcharge en fer progressive.

#### INDICATIONS DES EXPLORATIONS

Dépistage systématique d'une hémoglobinopathie :

- femme enceinte d'origine non caucasienne,
- nouveau-né d'origine non caucasienne,
- conjoint d'une femme enceinte porteuse d'une hémoglobinopathie.

Dépistage d'une hémoglobinopathie devant des signes cliniques et/ou biologiques évocateurs : anémie,

microcytose, polyglobulie, érythroblastose, anomalie morphologique des globules rouges, lithiase vésiculaire...

Suivis pré- et post-transfusionnels des patients porteurs d'une hémoglobinopathie (syndrome drépanocytaire majeur).

### RECOMMANDATIONS PREANALYTIQUES

Les différentes techniques d'exploration des hémoglobines sont réalisées sur sang total EDTA (5 mL de sang recueilli dans un tube à bouchon violet).

Le sang total doit être conservé à + 4 °C et transmis dans les plus brefs délais (< 48 – 72 heures).

### ■ QUESTIONS A POSER AU PATIENT

- Origine géographique ?
- Antécédents familiaux ?
- Grossesse éventuelle en cours ? Préciser le terme.
- Notion de transfusion récente (moins de trois mois) ?
- Notion de traitement par le fer en cours ou récent (durée du traitement) ?

### METHODES D'ANALYSE

La nomenclature des actes de biologie médicale retient trois groupes techniques pour l'exploration des hémoglobines :

- l'électrophorèse en gel de polyacrylamide B 60 (référence 1113 : cotation B60),
- l'électrophorèse citrate agar B 60 (référence 1114 : cotation B60).

Les cotations de ces deux examens 1113 et 1114 ne sont cumulables que lorsque l'électrophorèse en gel de polyacrylamide suggère la présence d'hémoglobine C ou E ;

- la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine par au moins une technique d'électrophorèse, et deux autres tests adaptés selon les besoins pour un résultat diagnostique d'orientation ; un commentaire et une conclusion accompagnent le compte rendu (référence 1120 : cotation B120).

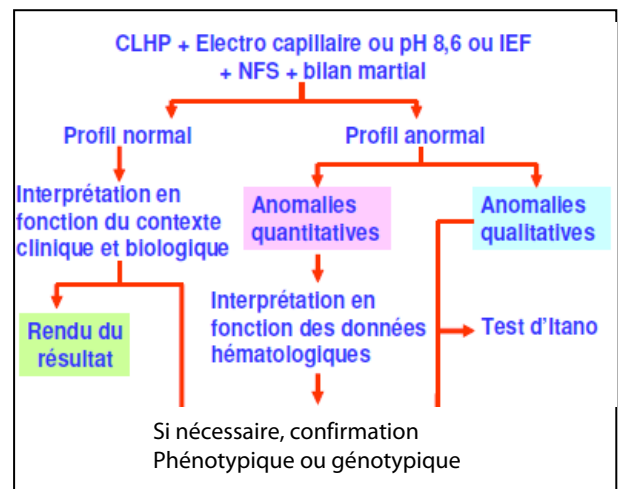
Par ailleurs d'autres méthodes d'analyse sont disponibles :

- la chromatographie liquide haute performance (CLHP), qui permet une quantification précise des fractions mineures de l'hémoglobine (Hb A2 et Hb foetale ou Hb F),
- l'électrophorèse capillaire,
- l'isoélectrofocalisation (IEF).

Or, les techniques d'électrophorèses ne permettent pas une quantification précise des différentes fractions hémoglobiques : Hb A2 et Hb F. De plus, une technique d'électrophorèse isolée, utilisée en dépistage, peut méconnaître une anomalie de l'hémoglobine. Le groupe de travail de la Société Française de Biologie

Clinique a rédigé en 2003 les bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine et a précisé que l'identification précise des hémoglobines anormales doit faire appel à un ensemble de techniques. Il ne faut pas oublier également que toute exploration de l'hémoglobine doit nécessairement être accompagnée d'un hémogramme et d'un bilan martial (et éventuellement de dosages de vitamine B12 et de folates).

Les recommandations pour le diagnostic des anomalies de l'hémoglobine en pratique quotidienne ont été présentées au 37<sup>ème</sup> colloque national des biologistes des hôpitaux en 2008 sous la forme d'algorithmes décisionnels détaillés pour le diagnostic des anomalies quantitatives et qualitatives. La stratégie générale d'exploration est la suivante :



biomnis – biomnis

Remarque : la recherche des drépanocytes par le test de falciformation (test d'Emmel), inscrite à la nomenclature sous la référence 1111, est une technique peu sensible.

### VALEURS DE REFERENCE

Chez l'adulte, l'hémoglobine normale majoritaire est l'Hb A.

Les valeurs normales des fractions hémoglobiques mineures, Hb A2 et Hb foetale, mesurées avec précision par la technique de CLHP, varient en fonction de l'âge et permettent le diagnostic des anomalies quantitatives de l'hémoglobine :

Age *	Hb A2	Hb F
nouveau-né	< 1 %	> 70 %
15 jours	0,5 – 1 %	60 – 70 %
1 mois	0,8 – 2,4 %	20 – 40 %
6 mois	2,4 – 3,0 %	5 – 10 %
1 an	2,8 – 3,3 %	< 3,0 %
adulte	< 3,3 %	< 1,0 %

\* données personnelles du Dr A. FRANCINA

L'Hb F peut persister de façon physiologique, inférieure à 3 % environ, jusqu'à l'âge de 5 ans.

## VARIATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

### ■ VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES

Au cours de la grossesse, le taux d'Hb F peut augmenter, surtout en fin de grossesse, par passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle.

### ■ VARIATIONS PATHOLOGIQUES

#### ■ Anomalies quantitatives

Un taux normal d'Hb A2, avec Hb F normale est compatible avec :

- une alpha-thalassémie (alpha-plus-thalassémie hétérozygote), avec bilan hématologique normal, résultant de l'anomalie d'un seul gène alpha sur quatre, objectivée par une exploration génomique ;
- un trait bêta-thalassémique masqué par une carence martiale, en présence d'une microcytose, une hypochromie et une carence martiale.

#### Augmentation de l'Hb A2, en présence d'Hb A normale

- Hb A2 comprise entre 3,6 % et 7,0 % : associée à une Hb F inférieure à 5,0 % et à une anémie microcytaire pseudopolyglobulique, il s'agit d'une bêta-thalassémie hétérozygote ou trait bêta-thalassémique (en l'absence de carence martiale)
- Hb A2 supérieure à la normale, mais inférieure ou égale à 3,6 %, peut se rencontrer dans les situations suivantes :
  - les traitements anti-rétroviraux (anti-VIH),
  - les hépatites virales B et C,
  - l'hyperthyroïdie,
  - les dysérythropoïèses,
  - les carences en vitamine B12 et folates,
  - la trisomie 21.

#### Diminution de l'Hb A2, en présence d'Hb A normale

- avec Hb F normale et en l'absence de microcytose :
  - delta-zéro-thalassémie hétérozygote
- avec Hb F modérément élevée et microcytose :
  - delta-bêta-thalassémie hétérozygote
- avec Hb F normale et microcytose :
  - carence martiale,
  - en l'absence de déficit en fer: alpha-thalassémie mineure (deux gènes alpha inactifs ou absents).

#### Augmentation de l'Hb F, en dehors de toute modification de l'Hb A2

- Hb F inférieure à 10 % :
  - hémolyses,

- traitements: Hydrea®, érythropoïétine, butyrates...,

- hémopathies: leucémie myélomonocytaire juvénile, anémie de Fanconi, maladie de Blackfan-Diamond.

- Hb F le plus souvent comprise entre 15 et 30 % :

- persistance héréditaire d'hémoglobine fœtale (PHHF) hétérozygote.

#### Absence d'Hb A

- Hb A2 normale ou peu élevée, Hb F > 90 % :

- bêta-thalassémie homozygote.

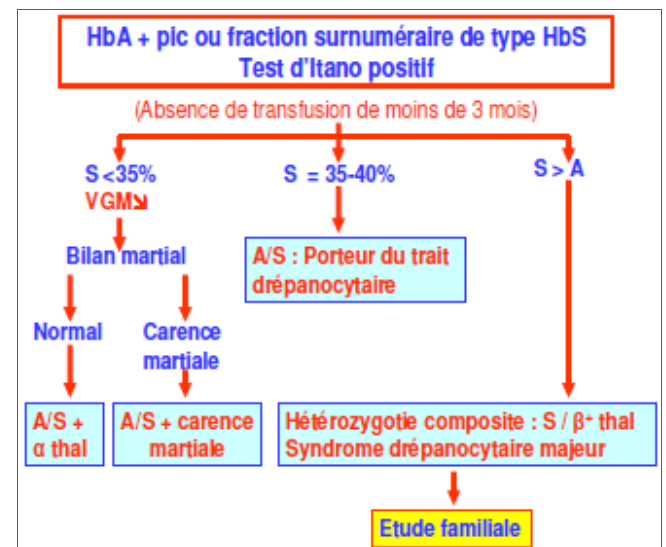
- Hb A2 nulle, Hb F > 90 % :

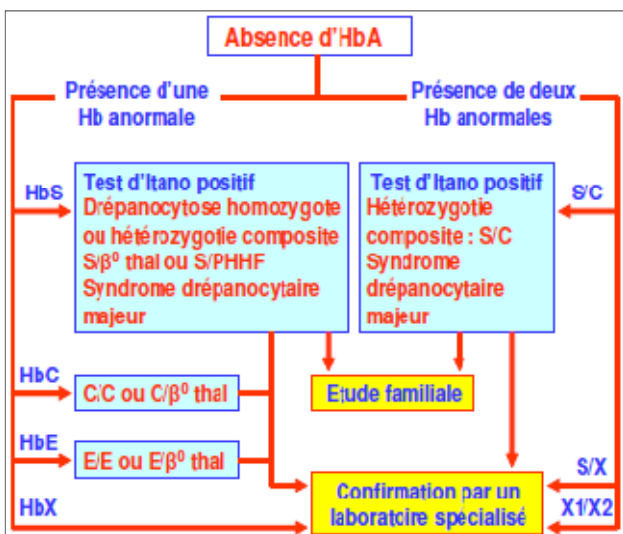
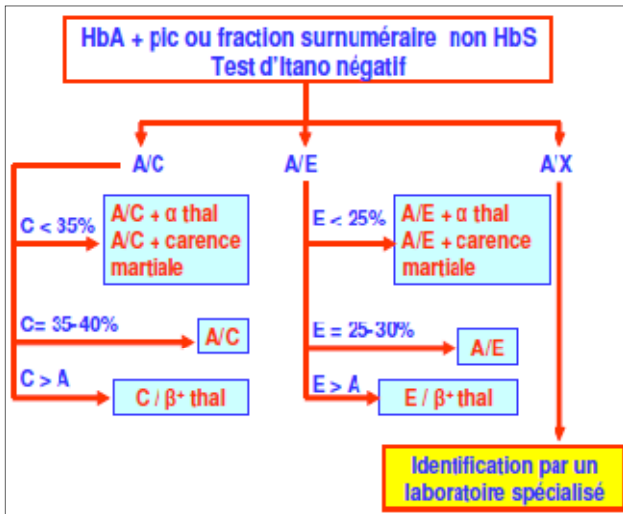
- avec un tableau de thalassémie: delta-bêta-zéro-thalassémie homozygote

- en l'absence de signe clinique: PHHF homozygote.

#### ■ Anomalies qualitatives

La mise en évidence des variants de l'hémoglobine les plus fréquents (Hb S, Hb C, Hb E) est réalisée en mettant en œuvre au moins trois techniques. Le diagnostic de ces hémoglobinopathies ou des anomalies associées (variant hémoglobinique et thalassémie) peut être établi en suivant les algorithmes présentés lors du 37<sup>ème</sup> colloque national des biologistes des hôpitaux en 2008 :





Ann Biol Clin 2003, 61:401-409.

■ F. Kaddari-Himeur, N. Couprie, R. Ducrocq, groupe de travail CNBH, *Recommandations pour le diagnostic des anomalies de l'hémoglobine en pratique quotidienne*, panneau affiché, 37<sup>ème</sup> colloque national des biologistes des hôpitaux en 2008.

■ A. Szymanowicz, A. Bernay, C. Lornage, *Etude comparative du dosage de l'hémoglobine glyquée par trois méthodes : HPLC sur G7<sup>®</sup> (Tosoh Bioscience) et D10<sup>®</sup> (Biorad), et immunoturbidimétrie sur Intégra 800<sup>®</sup> (Roche)*, IBS 2009, 24:272-280.

biomnis – biomnis

**Remarque**

La présence d'une hémoglobinopathie à l'état hétérozygote modifie le résultat du dosage de l'HbA1c. D'une part, chez ces patients le taux d'HbA1c vraie est diminué, et d'autre part, la glycation de l'hémoglobine anormale et la durée de vie des hématies contenant l'hémoglobine anormale ne sont pas connues. Si le dosage de l'HbA1c peut être utilisé, le patient est alors son propre témoin et le clinicien ne pourra interpréter que la variation du taux. Il semble toutefois préférable de suivre l'équilibre glycémique par le dosage sérique de la fructosamine. *A fortiori*, chez les patients diabétiques porteurs d'une hémoglobinopathie à l'état homozygote (absence d'Hb A), le dosage de l'HbA1c est impossible.

**POUR EN SAVOIR PLUS**

■ J. Bardakdjian-Michau, J.L. Dhondt, R. Ducrocq, groupe de travail SFBC « Recommandations dans le domaine des diagnostics des hémoglobinopathies » (responsable : F. Galactéros), *Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine*,

biomnis – biomnis

biomnis – biomnis