



Le test de précipitation en milieu réduit : une alternative au test d'Emmel dans le dépistage de l'hémoglobine S

M. GOMINA ASSOUMANOU, D. AHMED ISSIFOU et A.S. AKPONA *

UERS de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Parakou, BP: 123 Parakou, République du Bénin.

* Auteur correspondant, E-mail: akponasimon@yahoo.fr

RESUME

Les hémoglobinopathies sont définies par la présence d'anomalies qualitatives et/ou quantitatives touchant les chaînes de globine. Les anomalies qualitatives sont de loin les plus fréquemment observées avec en tête la drépanocytose. L'objectif de ce travail était, de montrer l'efficacité du test de précipitation en milieu réduit (TPMR) par rapport au test d'Emmel (TE) dans le diagnostic de l'hémoglobine S. Ainsi, sur les prélèvements sanguins de 415 sujets, sans distinction de sexe, nous avons réalisé en triple aveugle le test d'Emmel, le test de précipitation en milieu réduit et l'électrophorèse de l'hémoglobine sur gel d'agarose à pH = $6,0 \pm 0,2$ comme technique de référence. L'hémoglobine S a été retrouvée à 23,4% à l'électrophorèse de l'hémoglobine dans notre échantillon. Le TPMR avait les caractéristiques suivantes : sensibilité (98%), spécificité (100%), valeur prédictive positive (100%), valeur prédictive négative (99,40%) et indice de Youden (0,99). Le TE avait une sensibilité de 92,80%, une spécificité de 98,70%, une valeur prédictive positive de 95,70%, une valeur prédictive négative de 98%, et un indice de Youden de 0,92. Le TPMR peut remplacer le TE dans les laboratoires où l'électrophorèse de l'hémoglobine n'est pas réalisable.

© 2010 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Hémoglobinopathie, Technique, Electrophorèse de l'hémoglobine, TPMR, TE.

INTRODUCTION

La drépanocytose est une maladie autosomique récessive bien documentée tant sur le plan moléculaire que biochimique. C'est une hémoglobine largement répandue en Afrique et dans le monde en raison des flux migratoires qui entraînent les brassages entre les différentes populations (Gulbis et al., 2005). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2006, la fréquence du trait drépanocytaire atteint 15 à 30% dans les pays de l'Afrique occidentale. Dans les pays industrialisés à haut niveau de médicalisation,

la morbidité reste élevée (Serjeant, 1997 ; Stuart et Nagel, 1997 ; Benkerrou et al., 1999) de même que le risque de mortalité par syndrome thoracique aigu (Gill et al., 1995). En Afrique, le taux de mortalité avant cinq ans est assez élevé (20% à 30%) et peu d'enfants drépanocytaires atteignent l'âge de 15 ans (Platt et al., 1994 ; Gill et al., 1995).

Le diagnostic biologique des hémoglobinopathies repose sur deux principes. D'une part, la mise en évidence et la quantification des variantes dont la charge ou l'affinité pour un support permettent de les

séparer en fraction et, d'autre part, les dosages des fractions mineures (Pic et al., 1994 ; Lusina et al., 1998). Si dans les laboratoires des pays développés, l'électrophorèse de l'hémoglobine constitue l'examen de première intention (Lubin et al., 1991 ; Favier et al., 1993 ; Siguret et Andreux, 1997), la recherche de l'hémoglobine S ne se fait que par le test d'Emmel (TE) dans la plupart des laboratoires des centres de santé périphériques des pays du tiers monde. Les insuffisances d'un TE même bien pratiqué par un technicien consciencieux sont connues (Elion et Ducrocq, 1991 ; Wajcman, 2004). L'objectif visé par ce travail était de développer un test simple, peu coûteux et plus spécifique de l'hémoglobine S comme substitut du test d'Emmel, le test de précipitation en milieu réduit (TPMR).

MATERIEL ET METHODES

Population d'étude

L'étude a concerné 415 sujets volontaires des deux sexes (214 hommes contre 201 femmes) venus au laboratoire de biochimie du Centre Hospitalier Départemental du Borgou (République du Bénin) pour un bilan biologique. Il s'agissait d'une population homogène ($\epsilon = 0,65$). Le seul critère de non inclusion était une transfusion sanguine datant de moins de 120 jours. Les sujets ainsi sélectionnés ont fait l'objet de prélèvements sanguins veineux (3 ml) recueillis dans des tubes contenant de l'éthylène diamine tétra acétate (EDTA). Si les tests n'étaient pas réalisés le même jour, les échantillons de sang étaient conservés au réfrigérateur à 4 °C pendant une durée maximale d'une semaine.

Réactifs

Les réactifs tels que le dipotassium hydrogène phosphate (K_2HPO_4), le sulfate d'ammonium anhydre $(NH_4)_2SO_4$, la saponine pure, le dithionite de sodium ont été procuré du laboratoire Prolabo. L'hydragel

acid(e) hemoglobin(e) K20, a été obtenu du laboratoire Sebia.

Réalisation du test de précipitation en milieu réduit (TPMR)

La méthode proposée (TPMR) dérive de celle d'Itano (1953) que nous avons modifiée en termes de volume, de modalité de lecture et d'expression des résultats.

Préparation de la solution tampon : dans un bécher de 1 litre, nous avons mis 12 grammes de dipotassium hydrogène phosphate (K_2HPO_4), 30 grammes de sulfate d'ammonium anhydre $(NH_4)_2SO_4$, 1 gramme de saponine pure et nous avons complété avec de l'eau distillée à 1 litre. La solution obtenue a été chauffée au bain marie à 100 °C jusqu'à dissolution totale des solutés et conservée dans un flacon brun à l'abri de la lumière.

Préparation de la solution hémolysante réductrice : dans un bécher de 100 ml, nous avons mis 1 gramme de dithionite de sodium et complété à 100 ml par la solution tampon. Cette solution hémolysante réductrice a été préparée extemporanément au moment de l'emploi et transvasée dans un flacon brun.

Procédure de réalisation du TPMR : dans un tube à hémolyse propre et sec, nous avons introduit 2 ml de solution hémolysante réductrice et 0,1 ml de sang total prélevé sur EDTA. Nous avons mélangé par retournement pendant 30 secondes, et laissé incubé pendant 5 minutes avant de centrifuger à 5000 rpm pendant 5 minutes. L'aspect du culot et du surnageant a été noté.

Réalisation du test d'Emmel (TE)

Préparation de la solution de méta bisulfite de sodium à 2% (extemporanée) : dans un bécher de 50 ml, nous avons mis 0,5 gramme de dithionite de sodium et complété par de l'eau distillée à 25 ml. La solution a été conservée dans un flacon brun.

Procédure du TE : une goutte de sang total prélevé sur EDTA a été déposée au centre d'une lame porte objet et on y a ajouté

une goutte de solution de méta bisulfite de sodium à 2%. A l'aide du coin d'une lamelle couvre objet, nous avons mélangé les deux gouttes, puis recouvert la préparation d'une lamelle couvre objet sans emprisonner de bulle d'air. Après 30 minutes d'incubation, la lame a été lue au microscope optique aux objectifs 10 et 40, toutes les 30 minutes pendant deux heures.

Réalisation de l'électrophorèse de l'hémoglobine sur gel d'agarose à pH = 6,0 ± 0,2

L'électrophorèse de l'hémoglobine a été réalisée avec des kits prêts à l'emploi hydragel acid(e) hemoglobin(e) K20, obtenus du laboratoire Sebia. Selon les recommandations du fabricant, 10 µl de globules rouges lavés à l'eau physiologique issus du sang prélevé sur EDTA ont été incubés avec 130 µl de solution de lyse pendant 5 minutes. Puis 10 µl de l'hémolysa ont été déposés sur le gel d'agarose à l'aide d'un applicateur. La migration a été réalisée dans un tampon citrate pH = 6,0 ± 0,2 (120V, 10 ± 2 mA, 45 minutes). Les bandes ont été colorées à l'amidoschwartz.

Le test d'Emmel, le test de précipitation en milieu réduit et l'électrophorèse de l'hémoglobine ont été effectués en triple aveugle pour réduire les biais. Les deux tests qualitatifs (TE et TPMR) ont été comparés à l'électrophorèse de l'hémoglobine comme technique de référence.

L'analyse statistique a été faite avec le logiciel Epi Info 3.5, la significativité des différences recherchée avec l'écart-réduit (ϵ) au seuil de 5% et les éléments de performance (sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive, valeur prédictive négative, indice de Youden) utilisés pour comparer les tests.

RESULTATS

Le TPMR réalisé sur les 415 échantillons de sang a conduit à trois possibilités de résultats selon l'aspect du culot de centrifugation et du surnageant examiné à la lumière blanche et à l'œil nu (Figure 1). Le

TPMR était positif avec (+) dans 90 cas (21,70%) et l'était avec (++) dans 5 cas correspondant à 1,20%. Le TE était positif dans 94 cas (22,70%). Les hémotypes retrouvés à l'électrophorèse de l'hémoglobine étaient AA, AC, AS, SC, SS et CC. Le Tableau 1 montre la fréquence des hémotypes retrouvés dans la population d'étude. Les anomalies de l'hémoglobine étaient retrouvées dans 36,7% des cas. Au nombre de ces anomalies, l'hémoglobinopathie S était en tête avec 23,4% toute forme confondue.

Le Tableau 2 montre la répartition des hémotypes retrouvés à l'électrophorèse en fonction des résultats du TE. Les résultats permettent de se faire une idée des performances du TE rigoureusement bien pratiqué. Le TE bien pratiqué a montré néanmoins des faux négatifs (7 cas) et quelques faux positifs (4 cas). Le Tableau 3 montre la répartition de hémotypes retrouvés à l'électrophorèse en fonction des résultats du TPMR. Avec le TPMR tel que proposé, les faux négatifs n'étaient pas rares (2 cas). Le Tableau 4 montre la répartition des résultats du TPMR en fonction de ceux du TE. Le Tableau 5 indique la répartition de l'hémoglobine S à l'électrophorèse en fonction des résultats du TE. Le Tableau 6 montre la répartition de l'hémoglobine S à l'électrophorèse en fonction des résultats du TPMR. Les performances comparées du TE et du TPMR figurent au Tableau 7.

DISCUSSION

Ce travail nous a permis de réaliser d'une part le TE, le TPMR et l'électrophorèse de l'hémoglobine sur 415 échantillons de sang et, d'autre part, de comparer le TE au TPMR à travers leur sensibilité, leur spécificité, leur valeur prédictive positive (VPP), leur valeur prédictive négative (VPN) et leur indice de Youden en prenant comme référence l'électrophorèse de l'hémoglobine sur gel d'agarose à pH = 6,0 ± 0,2. La non quantification des fractions d'hémoglobine séparées à l'électrophorèse constituait la limite de ce travail.

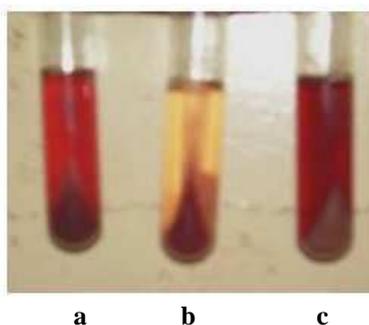


Figure 1: Résultats du TPMPR.

Un culot de centrifugation rouge et blanc avec un surnageant rose, donne un TPMPR positif à une croix (+) signant la présence d'Hb S ; le sujet est AS ou SC (Figure 1a). Un culot de centrifugation rouge avec un surnageant rose pâle, donne un TPMPR positif à deux croix (++) signant la présence de l'hémoglobine S en quantité très importante ; le sujet est homozygote SS ou Sβ thalassémique (Figure 1b). Un culot de centrifugation blanc avec un surnageant rouge bordeaux, donne un TPMPR négatif (-) signant l'absence d'hémoglobine S ; le sujet est AA, AC ou CC (Figure 1c).

Tableau 1: Fréquence des hémotypes dans la population d'étude.

	Nombre	Pourcentage (%) [IC]
AA	263	63,40 [58,50 – 68,00]
AC	51	12,30 [9,40 – 15,90]
AS	83	20,00 [16,30 – 24,20]
SC	9	2,20 [1,10 – 4,20]
SS	5	1,20 [0,40 – 3,00]
CC	4	1,00 [0,30 – 2,60]
Total	415	100

IC = intervalle de confiance.

Tableau 2: Répartition des hémotypes en fonction des résultats du TE.

	Hémotypes												Total
	AA		AC		AS		SC		SS		CC		
	Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%	
Négatif	260	81	50	15,60	7	2,20	0	0,00	0	0,00	4	1,20	321
Positif	3	32	1	1,10	76	80,90	9	9,60	5	5,30	0	0,00	94
Total	263	64,40	51	12,20	83	20,00	9	2,20	5	1,20	4	1,00	415

Nbr = Nombre.

Tableau 3: Répartition de hémotypes en fonction des résultats du TPMR.

	Hémotypes												Total
	AA		AC		AS		SC		SS		CC		
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	
A	263	82,20	51	15,90	2	0,60	0	0,00	0	0,00	4	1,30	320
B	0	0,00	0	0,00	81	90	9	100	0	0,00	0	0,00	90
C	0	0,00	0	0,00	0	0	0	0	5	100	0	0,00	5
Total	263	63,40	51	12,30	83	20,00	9	2,20	5	1,20	4	1,00	415

A = Culot Blanc, peu abondant et Surnageant Rouge bordeaux.
 B = Culot Blanc et Rouge, moyennement abondant et Surnageant rose.
 C = Culot Rouge et abondant, Surnageant Rose pâle.
 Nbre = Nombre.

Tableau 4 : Répartition des résultats du TPMR en fonction de ceux du TE.

	TPMR						Total
	(-)		(+)		(++)		
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	
Négatif	316	98,40	5	1,60	0	0,00	321
Positif	4	4,30	85	90,40	5	5,30	94
Total	320	77,10	90	21,70	5	1,20	415

TPMR = test de précipitation en milieu réduit.
 Nbre = Nombre.

Tableau 5 : Répartition de l'hémoglobine S à l'électrophorèse en fonction des résultats du TE.

	Hémoglobine S à l'électrophorèse		
	Présent	Absent	Total
TE Positif	90	4	94
TE Négatif	7	314	321
Total	97	318	415

TE = test d'Emmel.

Tableau 6 : Répartition de l'hémoglobine S à l'électrophorèse en fonction des résultats du TPMR.

	Hémoglobine S à l'électrophorèse		
	Présent	Absent	Total
TPMR positif	95	0	95
TPMR négatif	2	318	320
Total	97	318	415

TPMR = test de précipitation en milieu réduit

Tableau 7: Performance comparée du TE et du TPMR.

	TE	TPMR
Sensibilité (%)	92,80	97,90
Spécificité (%)	98,70	100,00
VPP (%)	95,70	100,00
VPN (%)	98,00	99,40
Indice de Youden	0,92	0,99

TE = test d'Emmel.

TPMR = test de précipitation en milieu réduit.

VPP = valeur prédictive positive.

VPN = valeur prédictive négative.

Sur l'ensemble des 415 échantillons, nous avons retrouvé à l'électrophorèse 152 cas (36,70%) d'hémoglobine pathologique S ou C. Plus du tiers de la population étudiée était porteur d'hémoglobinopathie qualitative. Ces résultats sont statistiquement superposables à ceux de Goasguen et al. (1974) dans une étude réalisée au sud du Dahomey, qui a montré 32% d'hémoglobinopathies ($\epsilon = 1,15$) et à ceux de Benkerrou et al. (1999) concernant des populations Noires d'Afrique au Sud du Sahara. L'hémoglobine anormale la plus rencontrée était l'Hb S avec une proportion de 23,40% comparable aux 24,50% de Goasguen et al. (1974) ($\epsilon = 0,42$). Par ailleurs 20% de la population était hétérozygote AS contre 2,20% de double hétérozygote SC et 1,20% d'homozygote SS.

Le test d'Emmel est le test le plus accessible dans l'exercice courant des laboratoires des pays du tiers monde. Il permet, lorsqu'il est bien pratiqué, de révéler la présence d'hémoglobine S. Les conditions de sa pratique exigent que le technicien soit consciencieux, qu'il prépare son réactif au jour le jour et que dans la lecture au microscope, il parcourt tous les champs pour se donner la chance de retrouver un globule

rouge en forme de faucille dont la structure est totalement différente des acanthocytes et des échinocytes. Dans le cadre de notre travail, le respect scrupuleux de toutes ces conditions ne nous a pas épargné des faux négatifs et des faux positifs inévitables dans ce test et qui en font les limites (Tableau 5). En effet, pour une valeur prédictive positive de 95,70%, une valeur prédictive négative de 98%, le test d'Emmel présente une sensibilité de 92,80%, une spécificité de 98,70% et un indice de Youden égal à 0,92 (Tableau 7). Il convient donc de prendre des précautions idoines dans l'utilisation de ce test que nous comparons au TPMR de pratique aussi facile mais de performance meilleure. En effet, le TPMR sans être de pratique plus contraignante que le test d'Emmel, donne une valeur prédictive positive de 100%, une valeur prédictive négative de 99,40% pour une sensibilité de 98%, une spécificité de 100% et un indice de Youden égal à 0,99 (Tableau 7). Testa et al. (1989) dans une étude comparative de quatre techniques de dépistage de la drépanocytose avaient trouvé que le test de solubilité de l'hémoglobine était le plus efficace avec une sensibilité de 99,3% et une spécificité de 97,8%. Dans la pratique, le TPMR, test mono réactif, requiert un tampon dont la préparation

est facile et les produits de base disponibles. Dans sa forme modifiée, il est de lecture plus facile, d'interprétation plus aisée par un technicien entraîné, rigoureux et méticuleux. Il nécessite cependant que le laboratoire dispose d'un centrifugeur qui est le seul équipement lourd dans la mise en pratique de ce test. Les avantages du TPMR qui autorisent d'affirmer la présence de l'Hb S, soit sous forme homozygote, soit sous forme hétérozygote, sont de loin plus importants que ceux du TE dont il n'a pas les inconvénients. Par ailleurs, ce test est plus sensible et plus spécifique dans le diagnostic de l'hémoglobine S (Tableau 7). Cependant, ce test est pris à défaut lorsque la quantité d'HbS est faible (inférieure à 10%) dans le globule rouge (Bardakdjian-Michau et al., 2003) comme en témoigne les deux cas de faux négatifs obtenus dans notre travail (Tableau 6). En pratique courante, l'adoption d'une technique de dosage ou de recherche à visée diagnostique dépend de sa simplicité, de sa praticabilité, et, de la possibilité qu'elle offre de réduire les causes d'erreurs extrinsèques et intrinsèques. Le test de précipitation en milieu réduit (TPMR) satisfait ces conditions.

Nous avons réalisé une étude comparative de deux tests : le test d'Emmel et le test de précipitation en milieu réduit avec l'électrophorèse de l'hémoglobine comme technique de référence. Nos résultats nous permettent de proposer, aux centres de transfusion sanguine et aux laboratoires ne disposant pas d'équipement pour l'électrophorèse de l'hémoglobine, l'utilisation du TPMR comme alternative dans le diagnostic spécifique de l'hémoglobine S.

REFERENCES

- Bardakdjian-Michau J, Dhondt JL, Ducrocq R, Galatéros F, Guyard A, Huchet FX, Lahary A, Lena-Russo D, Maboudou P, North ML, Prehu C, Soummer AM, Verschelde M, Wajcmam H. 2003. Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. *Ann. Biol. Clin.*, **61**(4): 401-409.
- Benkerrou M, Brahim L, Denamur E. 1999. Information génétique et diagnostic prénatal dans la drépanocytose. *Ann. Pédiatr. (Paris)*, **46**(7): 470-478.
- Elion J, Ducrocq R. 1991. Le Diagnostic des Hémoglobinopathies en 1990. *Sem. Hôp. Paris*, **67**(24): 1118-1126.
- Favier R, Ozsahin H, Laire V, Douay L. 1993. Apport du laboratoire dans le dépistage et le diagnostic des hémoglobinopathies en milieu pédiatrique. *Rev. Fr. Lab.*, **248**: 53-62.
- Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R. 1995. For the cooperative study of sickle cell disease. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. *Blood*, **86**: 776-783.
- Goasguen J, Laurens A, Delprat J, Bonnet M, Gillet JP, Moreau JP, Didier A. 1974. Etude de la répartition des hémoglobines au sud du Dahomey. *Médecine et Armées*, **2**(3): 215-218.
- Gulbis B, Ferster A, Kentos A, N'gay Munungi D, Cotton F, Rongé E, Dresse MF, Bradstreet C, Cochaux P, Vertongen F. 2005. La drépanocytose: une affection exotique ou un problème de santé publique en Belgique? *Rev. Med. Brux.*, **26**: 309-313.
- Itano HA. 1953. Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **184**: 148-159.
- Lubin BH, Witkowska HE, Kleman K. 1991. Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. *Clin. Biochem.*, **24** : 363-374.
- Lusina D, Sifi A, Mathieu P, Adam MN, Le Pennec MP, Guerout T, Baledent F. 1998. Evaluation of high performance liquid chromatography modular system for the

- diagnosis of haemoglobinopathies. *Ann. Biol. Clin.*, **56**(6): 734-739.
- Pic P, Ducrocq R, Girot R. 1994. Séparation des hémoglobines F, Fac, S, C et A1C et dosage de l'hémoglobine F par chromatographie liquide haute performance. *Ann. Biol. Clin.*, **52**: 129-132.
- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP. 1994. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N. Engl. J. Med.*, **330**: 1639-1644.
- Serjeant GR. 1997. Sickle cell disease. *Lancet*, **350** : 725-730.
- Siguret V, Andreux JP. 1997. Diagnostic biologique des hémoglobinopathies par analyse du phénotype. *Ann. Biol. Clin.*, **55**(2) : 103-112.
- Stuart MJ, Nagel RL. 2004. Sickle-cell disease. *Lancet*, **364** : 1343-1360.
- Testa J, Ngondy JJ, Gangba-Zero M, Dimanche L, Vihoto J. 1989. Etude comparative de quatre techniques de dépistage de la drépanocytose. *Médecine d'Afrique Noire*, **36**(12) : 925-928.
- Wajcman H. 2004. Diagnostic et dépistage de la drépanocytose. *La Revue du Praticien*, **54**: 1543-1547.