



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE**  
**2014**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**MEMOIRE**  
**du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional  
Le 13 Octobre 2014

par Valérie GUERARD  
née le 06/04/1988 à Pont-à-Mousson (54)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE**  
**pour le DIPLOME D'ETAT**  
**de DOCTEUR en PHARMACIE**

---

**Mise en place de l'électrophorèse capillaire MINICAP<sup>®</sup>**  
**(Sebia) pour le diagnostic des hémoglobinopathies au CHU**  
**de Nancy**

---

**Membres du Jury**

Président : Mme le Professeur B. FAIVRE, PU, Faculté de Pharmacie de Nancy

Juges : M. le Docteur J. PERRIN, MCU-PH, CHU de Nancy - *Directeur de thèse*  
M. le Professeur P. NGUYEN, PU-PH, CHU de Reims  
M. le Docteur S. SALIGNAC, PH, CHU de Nancy

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2014-2015**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Brigitte LEININGER-MULLER

**Président de la Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Président de la Commission Prospective Facultaire**

Chantal FINANCE

**Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable ERASMUS :**

Francine KEDZIEREWICZ

**Responsable de la filière Officine :**

Béatrice FAIVRE

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD,  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable de la filière Hôpital :**

Béatrice DEMORE

**Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :**

Raphaël DUVAL

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

**ENSEIGNANTS**Section  
CNU\*

Discipline d'enseignement

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Environnement et Santé
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

**MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique

<b>ENSEIGNANTS (suite)</b>	<b>Section CNU*</b>	<b>Discipline d'enseignement</b>
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Hygiène sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86	Droit en Santé
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

#### **PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

#### **PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

#### **\*Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je** jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

**D'** honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que** les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que** je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS  
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT  
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR  
AUTEUR ».

## **Remerciements**

### **A notre Président de Thèse,**

**Madame le Professeur Béatrice FAIVRE,**

PU, Faculté de Pharmacie de Nancy – Université de Lorraine

Vous m’avez fait l’honneur d’accepter la présidence de ce jury.

Veuillez trouver ici le témoignage de toute ma gratitude et de mes remerciements les plus sincères.

### **A notre Directeur de Thèse,**

**Monsieur le Docteur Julien PERRIN,**

MCU-PH, Faculté de Pharmacie de Nancy – Université de Lorraine, Service d’Hématologie Biologique – CHU de Nancy

Vous m’avez fait l’honneur de me confier ce travail et je vous remercie chaleureusement pour votre confiance, votre implication et votre gentillesse. Votre disponibilité et vos précieux conseils m’ont été d’une grande aide et je vous en suis sincèrement reconnaissante.

Veuillez trouver ici le témoignage de mon grand respect et de ma profonde gratitude.

### **A nos juges,**

**Monsieur le Docteur Sylvain SALIGNAC,**

PH, Service d’Hématologie Biologique – CHU de Nancy

C’est pour moi un grand honneur de vous compter parmi mes juges et je vous remercie sincèrement pour votre implication et votre participation dans la réalisation de ce travail.

Soyez assuré de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.



**Monsieur le Professeur Philippe NGUYEN,**

PU-PH, UFR de Médecine – Université de Reims Champagne-Ardenne, Laboratoire  
d'Hématologie – CHU Robert Debré à Reims,

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail et je vous en suis reconnaissante. Je vous remercie sincèrement d'avoir fait le déplacement jusqu'à Nancy pour être présent parmi nous.

Veillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de toute ma gratitude.

**A l'ensemble du personnel du laboratoire d'Hématologie – Secteur Exploration Fonctionnelle Cellulaire, et en particulier à Viviane,**

Un grand merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre aide précieuse dans la réalisation de ce travail qui, sans vous, n'aurait pas été possible.

**A tous ceux et celles qui ont participé à la réalisation de ce travail,**

Je remercie notamment toutes les personnes qui ont accepté de donner un peu de leur sang pour la réalisation de cette étude.

**Aux biologistes et techniciens que j'ai pu rencontrer durant ces quatre années d'Internat,**

Pour avoir pris le temps de me former au métier de biologiste médical.

**A mes parents,**

Pour votre présence et votre soutien tout au long de mes études et de ma vie. Vous avez toujours été là pour me conseiller et me guider. Merci pour les valeurs que vous m'avez transmises, notamment la valeur du travail qui m'a donnée l'envie d'apprendre et d'avancer. Sans vous, je n'en serais pas là.

**A Elise et Maxime, ma sœur et mon frère,**

Merci pour votre présence à chaque instant, votre gentillesse et votre bonne humeur. Je sais que je peux compter sur vous. Merci aussi à Stéphane, Vanessa, Anaïs et Célia.

**A mes grands-parents et toute ma famille,**

C'est toujours un grand plaisir de vous retrouver.

**A Pierre,**

Ma plus belle rencontre. Merci pour tout.

**A Joëlle et Lionel, Charles et toute la famille de Pierre,**

Merci pour votre grande gentillesse. J'apprécie beaucoup les moments passés en votre compagnie.

**A tous mes amis : Alex, Claire, Sophie, Sandra et Bastien, Justine, Julie et Paul, Emilie et Damien, Youcef, Emilie et Florent, Cihan, Maxime et tous les autres,**

Merci pour tous ces bons moments passés ensemble et ceux à venir !

**A mon amie Marthe,**

Qui nous a quittés trop tôt, et dont la gentillesse et les éclats de rire me manquent tellement.

**A mes co-internes,**

Ces quatre années d'Internat sont passées très vite à vos côtés. Ce fut un plaisir de partager tous ces moments avec vous.

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>8</b>
<b>I. LES HEMOGLOBINOPATHIES.....</b>	<b>9</b>
I.1. PHYSIOPATHOLOGIE DES HEMOGLOBINOPATHIES .....	9
I.1.1. <i>Physiologie de l'hémoglobine.....</i>	9
I.1.2. <i>Anomalies qualitatives de l'hémoglobine.....</i>	11
I.1.3. <i>Anomalies quantitatives de l'hémoglobine.....</i>	16
I.2. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES HEMOGLOBINOPATHIES.....	22
I.2.1. <i>Les différentes méthodes utilisées et leur évolution .....</i>	22
I.2.1.1. Méthodes électrophorétiques .....	22
I.2.1.2. Méthodes chromatographiques .....	25
I.2.1.3. Techniques hématologiques et biochimiques spécifiques.....	26
I.2.1.4. Place de la biologie moléculaire.....	28
I.2.2. <i>Stratégie diagnostique des hémoglobinopathies au CHU de Nancy avant l'implantation du système Minicap® (Sebia).....</i>	29
I.2.3. <i>Prise en charge de la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine par l'Assurance Maladie .....</i>	29
<b>II. L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE POUR LE DIAGNOSTIC DES HEMOGLOBINOPATHIES.....</b>	<b>31</b>
II.1. CHOIX DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE POUR LE DIAGNOSTIC DES HEMOGLOBINOPATHIES AU CHU DE NANCY.....	31
II.1.1. <i>Arguments pour l'implantation de l'électrophorèse capillaire .....</i>	31
II.1.2. <i>Nouvelle approche diagnostique des hémoglobinopathies au CHU de Nancy .....</i>	32
II.2. PRINCIPE DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE.....	32
II.3. FONCTIONNEMENT DU SYSTEME MINICAP® (SEBIA) .....	35
II.3.1. <i>Matériel et réactifs.....</i>	35
II.3.2. <i>Echantillons analysés.....</i>	36
II.3.3. <i>Technique analytique .....</i>	37
II.4. INTERPRETATION DES PROFILS ELECTROPHORETIQUES .....	37
<b>III. EVALUATION DU SYSTEME MINICAP® (SEBIA) .....</b>	<b>42</b>
III.1. ANALYSE DE RISQUES .....	42
III.2. EVALUATION DES PERFORMANCES.....	44
III.2.1. <i>Paramètres à évaluer.....</i>	44
III.2.2. <i>Précision .....</i>	47
III.2.2.1. Répétabilité.....	48
III.2.2.2. Fidélité intermédiaire .....	57
III.2.3. <i>Approche de la justesse.....</i>	65
III.2.4. <i>Incertitudes de mesure .....</i>	69
III.2.5. <i>Intervalle de mesure .....</i>	70
III.2.6. <i>Contamination inter-échantillons.....</i>	72

<i>III.2.7. Intervalle de référence .....</i>	<i>75</i>
<i>III.2.8. Corrélation avec la méthode déjà utilisée : l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin.....</i>	<i>77</i>
<b>III.3. COMPARAISON DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE MINICAP® (SEBIA) AVEC LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE DE HAUTE PERFORMANCE D-10® (BIORAD).....</b>	<b>78</b>
<i>III.3.1. Résultats.....</i>	<i>78</i>
<i>III.3.2. Avantages et inconvénients de chacune des deux méthodes .....</i>	<i>106</i>
<i>III.3.3. Choix de la méthode pour le rendu quantitatif des fractions de l'hémoglobine.....</i>	<i>107</i>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>109</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>111</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>119</b>

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIQ : Contrôle Interne de la Qualité

CLHP : Chromatographie Liquide de Haute Performance

CV : Coefficient de Variation

DHOS : Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins

EC : Electrophorèse capillaire

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

ET : Ecart-type

FEO : Flux électro-osmotique

FI : Fidélité intermédiaire

Hb : Hémoglobine

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

MLPA : Multiplex Ligation Probe Amplification

NABM : Nomenclature des Actes de Biologie Médicale

Nb : Nombre

PCR : Polymerase Chain Reaction

PHHF : Persistance Hériditaire de l'Hémoglobine Fœtale

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SHB : Service d'Hématologie Biologique

SIL : Système Informatique de Laboratoire

TCMH : Teneur Moyenne en Hémoglobine

VGM : Volume Globulaire Moyen

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Les principaux variants de l'hémoglobine et leurs caractéristiques clinico-biologiques.....	15
Tableau II. Caractéristiques clinico-biologiques des $\alpha$ -thalassémies.....	18
Tableau III. Caractéristiques clinico-biologiques des $\beta$ -thalassémies.....	21
Tableau IV. Analyse et gestion des risques relatifs à la technique d'électrophorèse de l'hémoglobine par le système Minicap <sup>®</sup> .....	43
Tableau V. Eléments à vérifier par bibliographie et/ou vérification sur site en portée flexible A.....	45
Tableau VI. Spécifications de fidélité intermédiaire (I), d'erreur de justesse (B) et d'erreur totale (TE) proposées par Ricos pour l'Hb A2, en fonction des variations biologiques intra-individuelle (CVw) et inter-individuelle (CVg).....	47
Tableau VII. Résumé des données obtenues lors de l'étude de répétabilité.....	57
Tableau VIII. Résultats de l'étude de fidélité intermédiaire sur Capillarys <sup>®</sup> réalisée par Keren <i>et al.</i> .....	57
Tableau IX. Résultats de l'étude de fidélité intermédiaire sur Capillarys Flex <sup>®</sup> réalisée par Greene <i>et al.</i> .....	59
Tableau X. Résultats de l'évaluation de l'inexactitude.....	69
Tableau XI. Résultats de l'évaluation des incertitudes de mesure.....	70
Tableau XII. Détermination de la limite de quantification de l'Hb F sur Capillarys <sup>®</sup> réalisée par Winichagoon <i>et al.</i> .....	71
Tableau XIII. Détermination de la limite de quantification de l'Hb A2 sur Capillarys <sup>®</sup> réalisée par Winichagoon <i>et al.</i> .....	71
Tableau XIV. Données recueillies pour chaque hémoglobine lors de l'étude de comparaison Minicap <sup>®</sup> / D-10 <sup>®</sup> (les valeurs minimales et maximales étant celles obtenues par le système Minicap <sup>®</sup> ).....	79
Tableau XV. Résultats de la comparaison entre la technique X (D-10 <sup>®</sup> ) et la technique Y (Minicap <sup>®</sup> ) pour chaque hémoglobine.....	88
Tableau XVI. Résultats obtenus par Keren <i>et al.</i> lors de l'étude de 228 échantillons dépourvus d'Hb S par électrophorèse capillaire Capillarys <sup>®</sup> et par CLHP Primus <sup>®</sup> .....	89
Tableau XVII. Résultats obtenus par Keren <i>et al.</i> lors de l'étude de 39 échantillons contenant de l'Hb S par électrophorèse capillaire Capillarys <sup>®</sup> et par CLHP Primus <sup>®</sup> .....	90

Tableau XVIII. Résultats obtenus par Greene <i>et al.</i> lors de l'étude de 164 échantillons par électrophorèse capillaire Capillarys Flex <sup>®</sup> et par CLHP Variant II <sup>®</sup> .....	93
Tableau XIX. Résultats par groupe d'échantillons de la comparaison entre l'électrophorèse capillaire Minicap <sup>®</sup> et la CLHP D-10 <sup>®</sup> pour la quantification de l'Hb A2.....	101
Tableau XX. Technique (CLHP ou électrophorèse capillaire) la plus adaptée pour la quantification de l'Hb A2 selon le type de profil.....	104
Tableau XXI. Résultats obtenus par Waneesorn <i>et al.</i> lors de l'étude de comparaison entre l'électrophorèse capillaire Capillarys 2 <sup>®</sup> et la CLHP Variant $\beta$ -Thalassémie Short Program <sup>®</sup> pour la quantification de l'Hb CS.....	106



## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure de l'hémoglobine : tétramère constitué de quatre chaînes de globine identiques deux à deux et de quatre molécules d'hème renfermant chacune un atome de fer.....	10
Figure 2. Evolution de la synthèse des différentes chaînes de globine au cours du développement humain.....	11
Figure 3. Hématies falciformes (ou drépanocytes) au microscope électronique à balayage et au microscope optique sur frottis sanguin.....	12
Figure 4. Frottis sanguin d'un cas d'hémoglobinose C homozygote avec nombreuses hématies cibles et microsphérocytes.....	13
Figure 5. Electrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin.....	23
Figure 6. Electrophorèse sur gel d'agar à pH = 6.....	24
Figure 7. Isoélectrofocalisation en gel d'agarose (Isolab®).....	25
Figure 8. Profil chromatographique d'un patient homozygote S/S en CLHP par échange de cations et en CLHP en phase inverse.....	26
Figure 9. Test de solubilité de l'hémoglobine S (test d'Itano).....	27
Figure 10. Corps de Heinz visibles au bleu de crésyl brillant.....	28
Figure 11. Représentation schématique d'un appareillage d'électrophorèse capillaire.....	33
Figure 12. Principe de l'électrophorèse capillaire, caractérisée par la présence du flux électro-osmotique à l'interface entre la paroi du capillaire et le tampon.....	33
Figure 13. Système d'électrophorèse capillaire Minicap® (Sebia) et son carrousel à 28 positions.....	35
Figure 14. Profil électrophorétique visualisé sur le logiciel Phoresis®, avec identification automatique des pics d'Hb A, Hb A2, Hb F, Hb S et Hb C et découpage en 15 zones de migration.....	38
Figure 15. Electrophorèse capillaire de l'hémoglobine d'un patient homozygote C/C.....	39
Figure 16. Electrophorèse capillaire de l'hémoglobine d'un mélange échantillon du patient homozygote C/C avec échantillon d'un patient adulte normal.....	39
Figure 17. Illustration de la comparaison entre l'électrophorèse sur acétate de cellulose et l'électrophorèse capillaire pour un patient 1 présentant un profil normal et pour un patient 2 présentant une augmentation de l'Hb F.....	77
Figure 18. Profil obtenu par CLHP pour un échantillon de patient présentant un trait Hb C...91	

Figure 19. Profil obtenu par électrophorèse capillaire pour le même cas que dans la figure 18.....	91
Figure 20. Profils électrophorétiques obtenus par Capillarys Flex <sup>®</sup> pour un échantillon contenant de l'Hb D et pour un échantillon contenant de l'Hb G-Philadelphia.....	95

# INTRODUCTION

Avec plus de 300 000 naissances d'individus affectés par an, les anomalies qualitatives et quantitatives de l'hémoglobine figurent parmi les anomalies génétiques les plus fréquentes dans le monde. Historiquement limitées à certaines régions du globe (Afrique et Asie principalement), elles se sont rapidement étendues aux pays occidentaux, en particulier dans les grands centres urbains, en raison des différents flux migratoires observés ces dernières décennies (3).

Un diagnostic précoce de certaines de ces anomalies permet une prise en charge précoce et une amélioration considérable de la qualité de vie des patients. Différentes techniques d'étude de l'hémoglobine ont été développées dans le passé, telles que l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin et l'électrophorèse en gel d'agarose à pH acide. Cependant, en raison du manque de sensibilité de ces dernières, d'autres techniques ont été mises au point pour le diagnostic des anomalies de l'hémoglobine. Ainsi, la chromatographie liquide de haute performance a contribué à l'identification plus rapide d'un grand nombre de variants de l'hémoglobine et à une quantification plus précise de l'hémoglobine A2 et de l'hémoglobine F. Une quantification précise de ces deux fractions, présentes en faible concentration, est en effet nécessaire pour établir une orientation diagnostique (54). Plus récemment, au début des années 2000, une méthode automatisée d'électrophorèse capillaire de zone a été développée pour le diagnostic des hémoglobinopathies. En effet, le système Capillarys® (Sebia, France), initialement conçu pour l'électrophorèse capillaire des protéines sériques, permet désormais la recherche des anomalies de l'hémoglobine (41).

L'arrivée de ces nouvelles technologies s'est accompagnée d'une actualisation des recommandations pour la stratégie diagnostique des hémoglobinopathies, celle-ci faisant nécessairement intervenir plusieurs techniques complémentaires (3). Suite à la publication de ces nouvelles recommandations en 2010, le Service d'Hématologie Biologique du CHU de Nancy a choisi de modifier sa stratégie de l'étude de l'hémoglobine, avec notamment mise en place du système d'électrophorèse capillaire Minicap® (Sebia), de même technologie que le système Capillarys®.

L'objectif de ce travail était de définir et d'évaluer la nouvelle stratégie adoptée pour la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine au laboratoire d'Hématologie du CHU de Nancy. Cela nous a notamment amené à décrire le fonctionnement du système d'électrophorèse capillaire Minicap® et à évaluer ses performances pour l'identification et la quantification des différentes fractions de l'hémoglobine. En outre, nous avons essayé d'explicitier l'intérêt de l'implantation de cette nouvelle technique en remplacement de celle précédemment utilisée. Nous avons également tenté d'évaluer le système Minicap® au sein de la démarche globale mise en œuvre lors d'une étude de l'hémoglobine et notamment sa complémentarité aux autres techniques.

# I. LES HEMOGLOBINOPATHIES

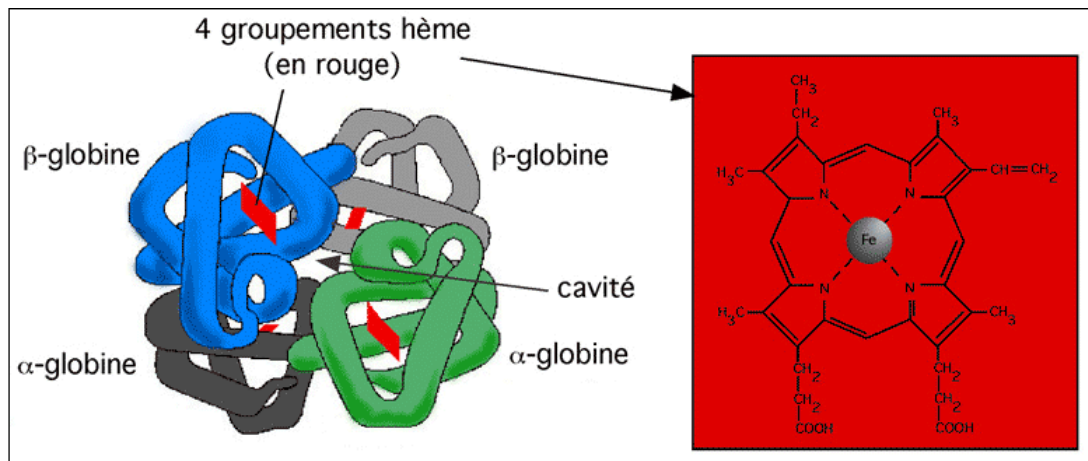
## I.1. PHYSIOPATHOLOGIE DES HEMOGLOBINOPATHIES

### I.1.1. Physiologie de l'hémoglobine

L'hémoglobine, principale protéine constitutive du globule rouge, a pour fonction essentielle de transporter l'oxygène des poumons aux tissus. Il s'agit d'un hétérotétramère constitué de quatre molécules d'hème et de quatre chaînes de globine, formant ainsi quatre sous-unités, identiques deux à deux (Figure 1) (87) (10).

L'hème résulte de l'association d'une partie organique, la porphyrine, et d'un atome de fer divalent. Cet atome de fer est un métal hexacoordinable. Il est lié par quatre liaisons au noyau porphyrine, par une liaison à la chaîne de globine et la dernière liaison permet le transport d'une molécule d'oxygène. Lors de la fixation de l'oxygène, l'atome de fer subit des réarrangements électroniques permettant son introduction dans la couronne de l'hème (77).

La globine constitue la partie protéique de l'hémoglobine. C'est un ensemble de quatre chaînes polypeptidiques, identiques deux à deux. Selon les périodes de la vie, plusieurs types de chaînes se distinguent : chez l'adulte, les hémoglobines physiologiques se composent de quatre types de chaînes polypeptidiques (alpha, bêta, gamma et delta) se différenciant par leur séquence en acides aminés. Ainsi, l'hémoglobine adulte (hémoglobine A) est constituée de deux chaînes alpha et de deux chaînes bêta ( $\alpha_2\beta_2$ ). L'hémoglobine A2 résulte de l'union de deux chaînes alpha et de deux chaînes delta ( $\alpha_2\delta_2$ ). Quant à l'hémoglobine fœtale (hémoglobine F), elle est formée de deux chaînes alpha et de deux chaînes gamma ( $\alpha_2\gamma_2$ ). La synthèse de la chaîne  $\alpha$  de la globine est dépendante de deux gènes  $\alpha$  identiques dupliqués en tandem sur le chromosome 16. Les gènes  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  sont quant à eux situés sur le chromosome 11 (38).

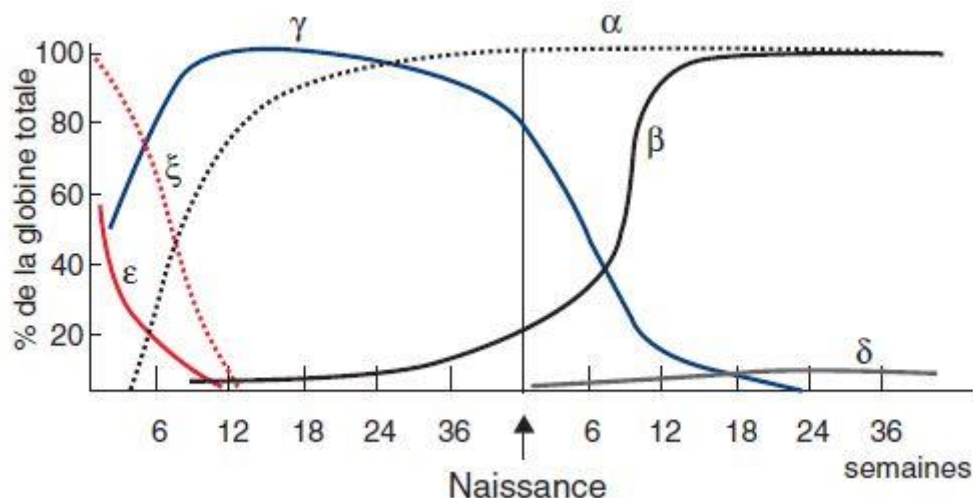


**Figure 1. Structure de l'hémoglobine : tétramère constitué de quatre chaînes de globine identiques deux à deux et de quatre molécules d'hème renfermant chacune un atome de fer (78).**

Au cours du développement humain, différentes chaînes de globines (et donc hémoglobines) sont successivement synthétisées et leurs proportions relatives évoluent selon plusieurs étapes. Une première commutation (ou switch) se produit au passage de la vie embryonnaire à la vie fœtale, puis une seconde commutation a lieu en période périnatale (Figure 2). Ces changements de nature des sous-unités de globine coïncident avec une modification du lieu de l'érythropoïèse, qui s'effectue au niveau du sac vitellin durant la vie embryonnaire, puis dans le foie et la rate durant la vie fœtale et enfin dans la moelle osseuse à partir de la période périnatale (87) (77).

Chez l'embryon, il existe simultanément trois hémoglobines à chaînes zêta, alpha, epsilon et gamma : l'hémoglobine Gower 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), l'hémoglobine Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) et l'hémoglobine Portland 1 ( $\zeta_2\gamma_2$ ). Les chaînes  $\epsilon$  et  $\zeta$  sont spécifiques de la vie embryonnaire et la chaîne  $\zeta$  présente une structure très proche de celle de la chaîne  $\alpha$ . A la fin du stade embryonnaire, l'expression du gène  $\epsilon$  est remplacée par celle des gènes fœtaux  $\gamma$  et l'expression du gène  $\zeta$  est remplacée par celle des gènes  $\alpha$ . L'hémoglobine F est alors détectable à partir de la cinquième semaine de vie intra-utérine et elle constituera la protéine hémoglobinique principale de la vie fœtale. Entre la huitième et la dixième semaine, son taux atteint 90 % pour ensuite légèrement diminuer jusqu'à la naissance où elle représente environ 80 % de l'hémoglobine totale. La seconde commutation, qui a lieu à la fin de la vie fœtale, conduit alors au remplacement des chaînes  $\gamma$  par les chaînes  $\beta$ . La synthèse des chaînes  $\beta$  commence en effet très lentement dès le dernier trimestre de gestation. Ainsi, durant la vie fœtale, l'hémoglobine A représente 5 à 10 % de l'hémoglobine totale. Après la naissance, la synthèse des chaînes  $\beta$  augmente rapidement et l'hémoglobine A prend une place prépondérante. A l'âge de 2 ans, le profil hémoglobinique de l'adulte est atteint et l'hémoglobine A représente alors plus de 95 % de la totalité des hémoglobines. Il existe également un constituant mineur : l'hémoglobine A2, dont le taux est environ de 2,5 % et qui est détectable dès le troisième mois de naissance. Chez l'adulte sain, il est également possible de détecter des traces d'hémoglobine F (< 1 %). Cette faible fraction d'hémoglobine F

présente à l'âge adulte est liée à une synthèse limitée dans un nombre restreint d'hématies appelées cellules F (77) (10) (3).



**Figure 2. Evolution de la synthèse des différentes chaînes de globine au cours du développement humain (58).**

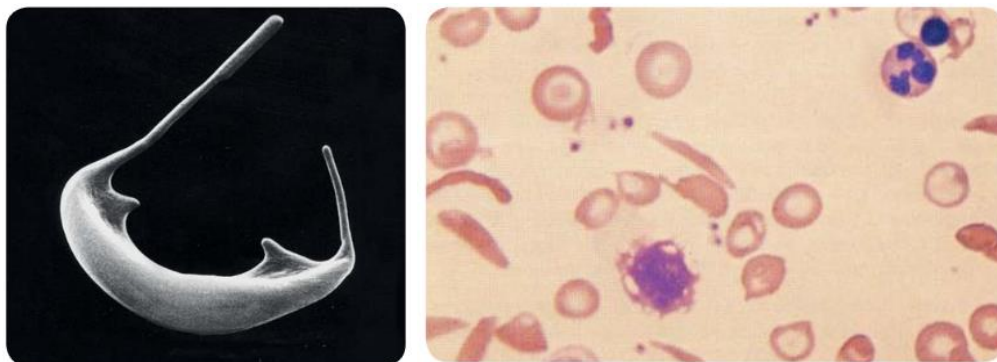
Une mutation de l'un des gènes codant pour les chaînes de globine peut aboutir à une hémoglobinopathie, correspondant soit à une anomalie qualitative soit à une anomalie quantitative de l'hémoglobine. Les anomalies qualitatives de l'hémoglobine, ou hémoglobinoses, sont liées à la production d'un variant de l'hémoglobine constitué d'une chaîne de globine anormale, les plus fréquentes étant les hémoglobines S, C et E. Les anomalies quantitatives, appelées thalassémies, correspondent à un déficit partiel ou complet de la synthèse de globine, sans altération de la protéine (51).

### I.1.2. Anomalies qualitatives de l'hémoglobine

A ce jour, plus de 800 variants d'hémoglobine ont été décrits (32). Toutefois, la majorité des variants de l'hémoglobine sont asymptomatiques et sont donc découverts fortuitement (72).

Quelques dizaines de variants seulement ont une importance clinique, dont l'hémoglobine S, responsable de la drépanocytose, et découverte en 1949 par Pauling *et al.* (74). Il s'agit de la plus fréquente des hémoglobinopathies, notamment en Afrique subsaharienne, mais également aux Antilles, en Inde, au Moyen-Orient et dans le bassin méditerranéen (58) (19). Toutefois, du fait des migrations de populations, les différentes hémoglobinopathies se sont répandues dans tous les pays et sont ainsi de plus en plus fréquentes en France (9) (13). La drépanocytose est due à une mutation ponctuelle sur le sixième codon du gène  $\beta$ -globine conduisant au remplacement d'un acide glutamique par une

valine ( $\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$ ) et donc à la synthèse d'une hémoglobine anormale : l'hémoglobine S. En condition de désoxygénation, cette hémoglobine S polymérise en longues fibres entraînant une rigidification et une déformation de l'hématie en forme de faucille (Figure 3). Les hématies, ayant perdu leur élasticité, obstruent les capillaires des organes, provoquant une ischémie par manque d'apport d'oxygène et donc des crises vaso-occlusives douloureuses. Par ailleurs, il survient une anémie hémolytique en raison de la plus grande fragilité des hématies (19) (64). Les sujets homozygotes (S/S) sont atteints et souffrent d'un syndrome drépanocytaire majeur. La concentration en hémoglobine se situe entre 6 et 10 g/dL et les hématies contiennent alors principalement de l'hémoglobine S, ainsi qu'une fraction d'hémoglobine F généralement augmentée (de l'ordre de 5 à 20 %) et une faible fraction d'hémoglobine A2. L'hémoglobine A est quant à elle absente. En revanche, lorsque la mutation  $\beta^S$  ( $\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$ ) ne concerne qu'un seul des deux gènes  $\beta$  (drépanocytose hétérozygote A/S), les sujets sont le plus souvent asymptomatiques. L'étude de l'hémoglobine montre un profil comportant environ 40 % d'hémoglobine S anormale et au moins 50 % d'hémoglobine A normale, les concentrations d'hémoglobine A2 et d'hémoglobine F restant normales. En outre, les formes hétérozygotes composites, dans lesquelles un allèle porteur de la mutation  $\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$  est associé à un allèle porteur d'une autre anomalie génétique (hémoglobine C, hémoglobine O-Arab, hémoglobine D-Punjab,  $\beta$ -thalassémie notamment), peuvent également être à l'origine de syndromes drépanocytaires majeurs (Tableau I) (51) (7).

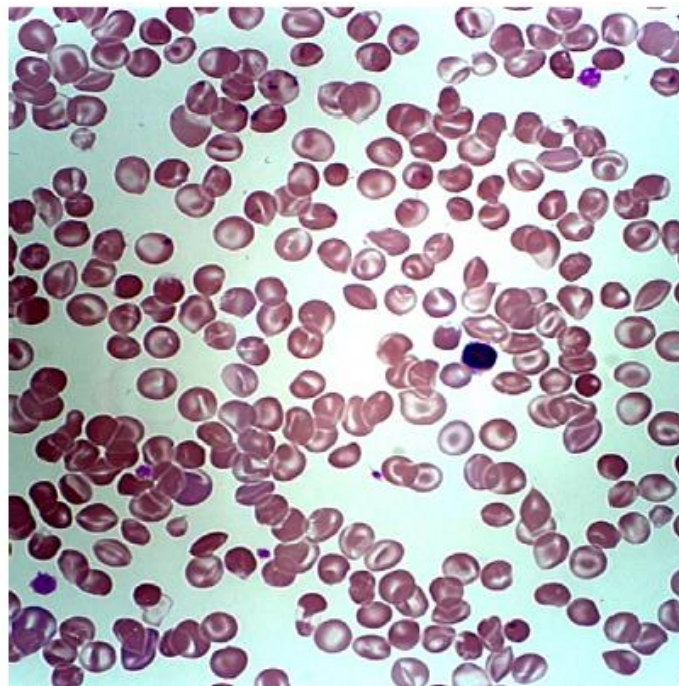


**Figure 3. Hématies falciformes (ou drépanocytes) au microscope électronique à balayage (à gauche) et au microscope optique sur frottis sanguin (à droite) (19).**

Le deuxième variant de l'hémoglobine le plus fréquent, après l'hémoglobine S, est l'hémoglobine C (51) (72). Celle-ci serait originaire du plateau voltaïque et se serait propagée par diffusion concentrique. Elle est ainsi très répandue dans les zones impaludées de l'Afrique de l'Ouest, notamment au niveau du golfe du Bénin, au Ghana et aux Antilles françaises. Toutefois, des cas d'hémoglobinose C apparemment autochtones ont également été observés en Asie du Sud-Est, remettant en cause cette théorie (58) (76). L'hémoglobine C résulte d'une mutation ponctuelle sur le gène de la chaîne  $\beta$  de la globine, aboutissant à la substitution en position 6 d'un acide glutamique par une lysine. Les individus hétérozygotes (A/C) sont cliniquement asymptomatiques mais peuvent présenter sur le plan hématologique une



microcytose modérée. Quant aux sujets homozygotes (C/C), ils présentent le plus souvent des manifestations bénignes, liées à une hémolyse compensée avec splénomégalie. Les complications potentielles apparaissant à l'âge adulte sont notamment l'hypersplénisme, des crises douloureuses abdominales et articulaires, la lithiase biliaire, la carence en folates et des rétinopathies (72) (34). Sur le plan hématologique, ces patients présentent une discrète anémie hémolytique microcytaire et une proportion importante d'hématies cibles sur le frottis sanguin (Figure 4), ainsi que des hématies contenant des cristaux d'hémoglobine C (Tableau I) (51) (22).



**Figure 4. Frottis sanguin d'un cas d'hémoglobinoase C homozygote avec nombreuses hématies cibles et microsphérocytes (72).**

Le troisième variant de l'hémoglobine le plus fréquent est l'hémoglobine E, très présente notamment en Asie du Sud-Est (91). Elle résulte d'une mutation faux sens du codon 26 du gène  $\beta$ -globine remplaçant un acide glutamique par une lysine. Ceci crée un site alternatif d'épissage, partiellement utilisé, qui dévie une partie de l'ARN messager (ARNm) vers une maturation anormale, aux dépens de la production d'ARNm normal. Cette substitution d'acides aminés conduit donc à un défaut de production d'hémoglobine par diminution du taux d'ARNm normal, sans affecter la fonction de l'hémoglobine (38). L'hémoglobinoase E se présente donc comme une thalassémie discrète. Les sujets hétérozygotes (A/E) sont asymptomatiques, tandis que les sujets homozygotes présentent une discrète anémie hémolytique microcytaire et légèrement hypochrome en général bien tolérée (51). La gravité de l'hémoglobinoase E tient surtout à son association avec diverses formes d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -thalassémies. En outre, ces associations sont relativement fréquentes en raison du paludisme qui a sélectionné et amplifié ces différentes formes au sein des mêmes populations.



Beaucoup de ces formes composites sont graves, elles peuvent présenter des phénotypes complexes et le diagnostic peut se montrer difficile. D'une manière générale, le diagnostic repose sur la mise en évidence de l'hémoglobine E, souvent associée à un pourcentage élevé d'hémoglobine F (10 à 15 %) (Tableau I) (69).

**Tableau I. Les principaux variants de l'hémoglobine et leurs caractéristiques clinico-biologiques.**

Anomalie génétique	Expression clinique	Diagnostic biologique							
		Hémogramme	Frottis	Etude de l'Hb					
				Hb A (%)	Hb F (%)	Hb A2 (%)	Hb S (%)	Hb C (%)	Hb E (%)
Hétérozygotie A / S	Asymptomatique	Normal	Normal	60-65	< 1	2,5-3,5	35-40	-	-
Homozygotie S / S	Syndrome drépanocytaire majeur	Hb : 6-10 g/dL VGM : normal	Drépanocytes Cellules cibles Corps de Jolly Erythroblastes	0	5-20	2,5-3,5	80-95	-	-
Hétérozygotie composite S / C	Syndrome drépanocytaire majeur	Hb : 10-12 g/dL VGM : 70-90 fL	Drépanocytes Cellules cibles	0	1-7	2,5-3,5	50	45	-
Hétérozygotie composite S / $\beta$ -thalassémie	Syndrome drépanocytaire majeur	Hb : 7-12 g/dL VGM : 60-95 fL	Anisocytose Poikilocytose Drépanocytes Cellules cibles Corps de Jolly	0-25	5-15	variable	55-90	-	-
Hétérozygotie A / C	Asymptomatique	Normal (parfois discrète microcytose)	Normal	60-65	< 1	2,5-3,5	-	35-40	-
Homozygotie C / C	Anémie hémolytique chronique modérée	Hb : 10-13 g/dL VGM : 65-75 fL	Cellules cibles Cristaux d'Hb C	0	< 3	2,5-3,5	-	> 90	-
Hétérozygotie A / E	Asymptomatique	Normal (ou discrète microcytose)	Normal	70-75	< 1	2,5-3,5	-	-	25-30
Homozygotie E / E	Anémie hémolytique modérée, bien supportée	Hb : 10-13 g/dL VGM : 65-75 fL	Cellules cibles	0	< 15	2,5-3,5	-	-	> 85
Hétérozygotie composite E / $\beta$ -thalassémie	Thalassémie intermédiaire	Hb : 7-12 g/dL VGM : 65-80 fL	Cellules cibles Anisocytose Poikilocytose	0-25	5-15	variable	-	-	> 40

Plus rarement rencontrées, les hémoglobines instables constituent également un type d'hémoglobines anormales. Elles sont caractérisées par une tendance à la dénaturation, avec formation de corps amorphes ou corps de Heinz à l'intérieur de l'érythrocyte. Ces inclusions diminuent la durée de vie des hématies et sont responsables d'anémies hémolytiques de sévérité variable. Actuellement, on connaît plus d'une centaine d'hémoglobines instables cliniquement significatives, parmi lesquelles figurent l'hémoglobine Köln, l'hémoglobine Zurich ou encore l'hémoglobine Hasharon (42) (77).

Enfin, les hémoglobines hyperaffines pour l'oxygène représentent un autre type d'hémoglobines anormales rares. En raison d'une mauvaise distribution de l'oxygène aux tissus, les patients porteurs d'une hémoglobine hyperaffine développent une polyglobulie réactionnelle, induite par une synthèse accrue d'érythropoïétine. Parmi ces hémoglobines anormales à haute affinité, on peut citer l'hémoglobine Tak et l'hémoglobine Pierre-Bénite notamment (3) (42).

### I.1.3. Anomalies quantitatives de l'hémoglobine

Les anomalies quantitatives de l'hémoglobine, appelées thalassémies, résultent d'une insuffisance de synthèse d'une ou plusieurs chaînes de globine, sans altération de la protéine. Selon la chaîne insuffisamment synthétisée, on distingue les  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\delta\beta$ - et  $\gamma\beta$ -thalassémies, les  $\alpha$ - et  $\beta$ -thalassémies étant les plus fréquemment décrites. Celles-ci sont particulièrement fréquentes dans les pays infestés par le paludisme. En effet, les personnes présentant un trait thalassémique sembleraient protégées contre les formes graves de paludisme. La principale conséquence du déficit de synthèse d'une ou plusieurs chaînes de globine est un déséquilibre entre les chaînes, avec excès de chaînes non appariées. Ces dernières forment des polymères peu solubles dans l'érythroblaste, conduisant à des altérations des membranes cellulaires et nucléaires et finalement à la destruction de l'érythroblaste. Il en résulte une érythropoïèse inefficace et une anémie, qui tentent d'être compensées par une hypersécrétion d'érythropoïétine qui stimule l'érythropoïèse. Cela aboutit alors à une hyperplasie érythroblastique dans les espaces médullaires, responsable de déformations osseuses. D'autre part, les quelques réticulocytes ayant réussi à maturer subissent en partie une destruction en périphérie, appelée hyperhémolyse (58) (71).

Les  $\alpha$ -thalassémies sont particulièrement fréquentes en Asie du Sud-Est et en Afrique équatoriale mais on les rencontre également autour du bassin méditerranéen. Puisqu'il existe normalement deux gènes  $\alpha$  ( $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ) situés sur chaque chromosome 16, donc quatre gènes  $\alpha$  fonctionnels, quatre phénotypes peuvent être distingués selon le nombre de gènes  $\alpha$  inactivés (Tableau II) (58) (79). Cette inactivation des gènes  $\alpha$  est principalement liée à des délétions au niveau du locus  $\alpha$  (51) (71).

Lorsque trois gènes  $\alpha$  sur quatre sont fonctionnels, il s'agit d'une  $\alpha$ -thalassémie hétérozygote silencieuse. En effet, aucun signe clinique n'est retrouvé. Au niveau biologique, on observe un taux très modérément augmenté (1 à 2 %) d'hémoglobine Bart's à la naissance, correspondant à un tétramère  $\gamma_4$ . L'étude de l'hémoglobine se normalise ensuite et l'héogramme est normal dans 50 % des cas, ou peut sinon montrer une discrète microcytose.

Les inactivations de deux gènes  $\alpha$  sont responsables d' $\alpha$ -thalassémies mineures, dont le génotype peut être de type  $(-\alpha/-\alpha)$  ou  $(--/\alpha\alpha)$  selon la localisation chromosomique de l'anomalie génétique. Les sujets sont cliniquement asymptomatiques. Biologiquement, à la naissance, le taux d'hémoglobine Bart's est compris entre 5 et 10 %. A l'âge adulte, la biologie montre une hypochromie, une microcytose, un taux normal d'hémoglobine F tandis que le taux d'hémoglobine A2 peut être normal ou légèrement diminué.

La non-fonctionnalité de trois gènes  $\alpha$  sur quatre est responsable d'hémoglobinoase H. A la naissance, l'anomalie est asymptomatique mais montre biologiquement un taux élevé d'hémoglobine Bart's ( $\gamma_4$ ), de l'ordre de 25 à 30 %, qui sera progressivement remplacée par l'hémoglobine H (tétramère  $\beta_4$ ). Certains patients restent cliniquement asymptomatiques tandis que d'autres développent une anémie hémolytique chronique hypochrome microcytaire de sévérité variable, avec splénomégalie, ictère, modifications osseuses et parfois lithiase biliaire pigmentaire.

Enfin, lorsque les quatre gènes  $\alpha$  ont subi une délétion, on retrouve une  $\alpha$ -thalassémie homozygote responsable d'une perte fœtale dans un tableau d'anasarque foeto-placentaire (Bart's hydrops fetalis). Cette anomalie est surtout rencontrée en Asie du Sud-Est où existent des grandes délétions englobant les deux gènes  $\alpha$ . Cependant, quelques foyers sont aussi retrouvés en Méditerranée orientale.

**Tableau II. Caractéristiques clinico-biologiques des  $\alpha$ -thalassémies.**

Phénotype	Génotype	Tableau clinique	Diagnostic biologique	
			Hémogramme	Etude de l'Hb
$\alpha$ -thalassémie hétérozygote silencieuse	$\alpha\alpha/-\alpha$	Asymptomatique	Normal ou discrète microcytose ou discrète anémie microcytaire hypochrome	1 à 2 % d'Hb Bart's à la naissance  Normale chez l'adulte
$\alpha$ -thalassémie mineure	$-\alpha/-\alpha$ $--/\alpha\alpha$	Asymptomatique	Microcytose Hypochromie $\pm$ Discrète anémie	5 à 10 % d'Hb Bart's à la naissance  Normale chez l'adulte (ou Hb A2 légèrement diminuée)
Hémoglobinoses H	$-\alpha/--$	Asymptomatique à la naissance  Anémie hémolytique chronique avec ictère, splénomégalie, parfois lithiase	Anémie hémolytique microcytaire et hypochrome (Hb : 3-10 g/dL)	20 à 30 % d'Hb Bart's à la naissance  1 à 30 % d'Hb H chez l'adulte Hb A2 diminuée (1 à 2 %) Hb F parfois augmentée (1 à 3 %)
Hydrops foetalis de Bart	$--/--$	Mort fœtale <i>in utero</i> dans un tableau d'anasarque foeto-placentaire		

Plus souvent observées dans nos populations que les  $\alpha$ -thalassémies, les  $\beta$ -thalassémies figurent parmi les anomalies génétiques les plus fréquentes (58) (51) (38). Initialement décrites dans les populations du bassin méditerranéen, elles sont aussi très répandues au Moyen-Orient, dans toute l'Asie du Sud et du Sud-Est, en Afrique de l'Ouest et aux Antilles.

Les  $\beta$ -thalassémies sont caractérisées par une diminution de l'expression de la chaîne  $\beta$ , qui peut être totale ou partielle, non ou incomplètement compensée par la synthèse de la chaîne homologue  $\gamma$ . En l'absence totale de synthèse de chaîne  $\beta$  et donc d'hémoglobine A, on parle de  $\beta^0$ -thalassémie. Lorsque le déficit de synthèse de la chaîne  $\beta$  n'est que partiel, il s'agit d'une  $\beta^+$ -thalassémie. Les  $\beta$ -thalassémies sont en grande majorité dues à des mutations ponctuelles mais elles peuvent également résulter de microdélétions ou d'insertions de nucléotides.

Selon les manifestations phénotypiques, en l'occurrence la profondeur de l'anémie et les besoins transfusionnels, plusieurs formes de  $\beta$ -thalassémies peuvent être distinguées (Tableau III) (45) (71). Cette distinction ne peut être réalisée qu'après quelques mois de vie, lorsque la synthèse de l'hémoglobine F n'est plus capable de masquer l'anomalie de synthèse de l'hémoglobine A.

Tout d'abord, la  $\beta$ -thalassémie majeure, aussi appelée anémie de Cooley, se caractérise par l'absence totale de chaînes  $\beta$ , correspondant au génotype  $\beta^0/\beta^0$ . Elle est révélée dès l'enfance par une anémie hémolytique très sévère associée à une hépatosplénomégalie et à des anomalies morphologiques résultant de l'hyperplasie des os plats secondaire à l'hyperactivité érythroïde. L'hémoگرامme révèle une anémie inférieure à 7 g/dL, microcytaire (volume globulaire moyen entre 60 et 65 fL), hypochrome (teneur moyenne en hémoglobine inférieure à 26 pg). Le frottis sanguin met en évidence une anisopoïkilocytose, des ponctuations basophiles fréquentes ainsi qu'une érythroblastose majeure. L'étude de l'hémoglobine permet le diagnostic, elle montre un pourcentage élevé d'hémoglobine F, allant de 50 à 98 % selon la synthèse résiduelle de la chaîne  $\beta$ . Le taux d'hémoglobine A2 est variable.

Les  $\beta$ -thalassémies intermédiaires constituent une autre forme de  $\beta$ -thalassémie et sont caractérisées par une anémie dont le taux d'hémoglobine se maintient entre 6 et 10 g/dL, ne requérant pas de transfusion mensuelle. Leur génotype est de type  $\beta^0/\beta^+$  ou  $\beta^{+}/\beta^{+}$ . Seule l'observation des besoins transfusionnels permet de distinguer une thalassémie intermédiaire d'une thalassémie majeure. Les  $\beta$ -thalassémies intermédiaires se manifestent le plus souvent par une anémie hémolytique modérée avec pâleur et hépatosplénomégalie, pouvant éventuellement s'accompagner des complications osseuses de l'hyperplasie érythroblastique médullaire.

Les  $\beta$ -thalassémies mineures sont quant à elles définies par un génotype hétérozygote de type  $\beta^0/\beta$  et se manifestent biologiquement par une pseudopolyglobulie associée à une microcytose et une hypochromie. Le pourcentage d'hémoglobine A2 est élevé (supérieur à 3,5 %) tandis que celui de l'hémoglobine F est normal ou discrètement augmenté. Cliniquement, les patients sont bien portants et dénués de signes d'anémie. Exceptionnellement toutefois, une discrète splénomégalie peut être observée.

Enfin, les  $\beta$ -thalassémies silencieuses, de génotype  $\beta^+/\beta$ , sont asymptomatiques cliniquement et hématologiquement.

**Tableau III. Caractéristiques clinico-biologiques des  $\beta$ -thalassémies.**

Phénotype	Génotype	Tableau clinique	Diagnostic biologique	
			Hémogramme	Etude de l'Hb
$\beta$ -thalassémie silencieuse	$\beta^{+}/\beta$	Asymptomatique	Normal	Normale
$\beta$ -thalassémie mineure	$\beta^{\circ}/\beta$	Asymptomatique (parfois discrète microcytose)	Pseudopolyglobulie microcytaire hypochrome ou microcytose isolée	Hb A2 $\uparrow$ (4 à 5 %) Hb F normale ou $\uparrow$ (2 à 7 %)
$\beta$ -thalassémie intermédiaire	$\beta^{\circ}/\beta^{+}$ $\beta^{+}/\beta^{+}$	Anémie hémolytique modérée avec hépatosplénomégalie  Transfusions sanguines exceptionnelles	Anémie microcytaire (Hb : 6-10 g/dL)	Hb A2 $\uparrow$ Hb F $\uparrow$ Hb A absente ou $\downarrow$
$\beta$ -thalassémie majeure	$\beta^{\circ}/\beta^{\circ}$	Anémie apparaissant au cours des premiers mois de la vie Hépatosplénomégalie et anomalies morphologiques  Evolution fatale en l'absence de transfusions sanguines	Anémie microcytaire hypochrome (Hb < 7 g/dL)	Hb F $\uparrow\uparrow$ (50 à 98 %) Hb A2 normale ou $\uparrow$ Hb A absente ou $\downarrow\downarrow$ selon les types d'anomalies moléculaires en cause



## I.2. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES HEMOGLOBINOPATHIES

Plusieurs situations peuvent conduire à la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine (14) (51) (11), dont :

- le diagnostic étiologique d'anomalies biologiques :
  - anomalie de l'héogramme (anémie, microcytose, pseudopolyglobulie) et/ou du frottis sanguin (hématies cibles, drépanocytes, poikilocytose, ponctuations basophiles, corps de Jolly)
  - signes d'hémolyse (bilirubine libre augmentée, haptoglobine effondrée)
  - découverte fortuite d'un variant de l'hémoglobine lors du dosage de l'hémoglobine glyquée
- le diagnostic étiologique d'anomalies cliniques :
  - anémie hémolytique
  - polyglobulie
  - cyanose
- l'enquête familiale suite à la découverte d'une hémoglobinopathie
- le dépistage maternel au cours de la grossesse chez les femmes originaires de pays à risque (Afrique du Nord, Afrique noire, Extrême-Orient, bassin méditerranéen, Antilles...)
- le dépistage néonatal systématique chez tous les nouveau-nés à risque

### I.2.1. Les différentes méthodes utilisées et leur évolution

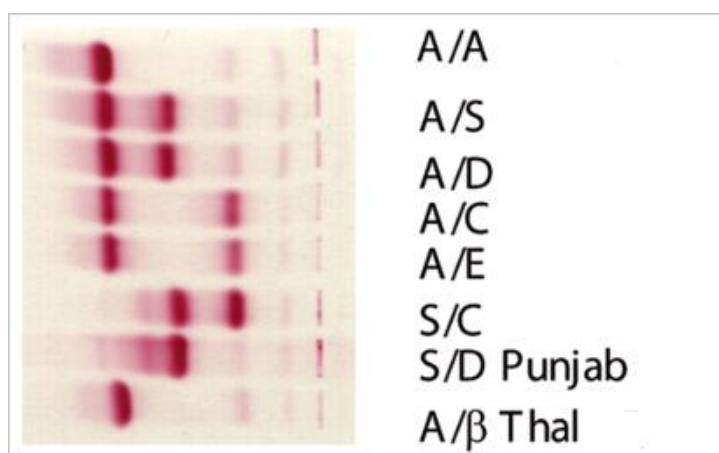
#### I.2.1.1. Méthodes électrophorétiques

Historiquement, l'électrophorèse s'est imposée comme la méthode de choix pour l'identification et la quantification des différentes fractions de l'hémoglobine. L'électrophorèse implique la séparation d'espèces chargées sous l'influence d'un champ électrique, généralement basée sur leur rapport charge/masse. Cette technique est particulièrement bien adaptée à l'étude de l'hémoglobine, dont les principaux variants peuvent être distingués par des rapports charge/masse différents. Initialement développée par Tiselius dans les années 1930, l'électrophorèse en veine liquide, réalisée dans un tube en U, a par la suite été supplantée par l'électrophorèse de zone, pratiquée dans une trame solide imprégnée d'une solution tampon (24) (84) (61).

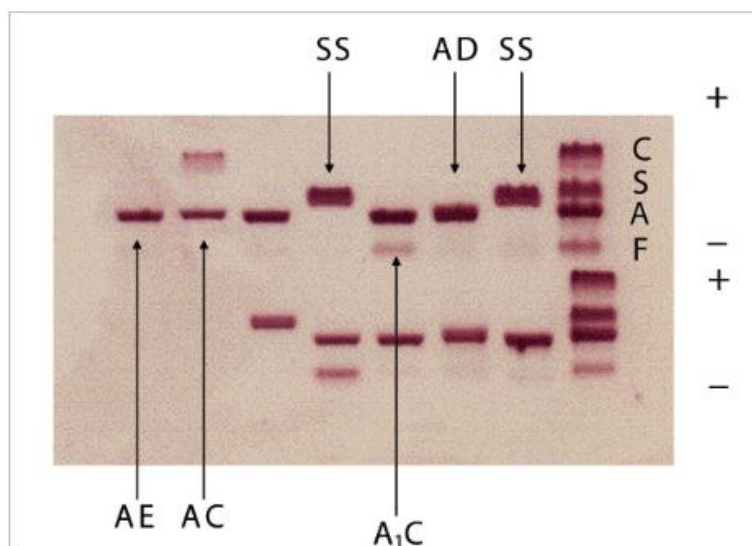
Une des techniques d'électrophorèse utilisée pour le diagnostic des hémoglobinopathies est l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin (Figure 5). Plusieurs méthodes commerciales ont été développées, les bandes d'hémoglobines étant visualisées grâce à des colorants et quantifiées par densitométrie. Toutefois, à pH alcalin (classiquement pH 8,6), les hémoglobines A2, C, E et O migrent dans la même zone, de même que les hémoglobines S, D

et G migrent selon la même vitesse (74). Dans le cas de suspicions de telles anomalies de l'hémoglobine, une technique complémentaire doit donc être envisagée.

La distinction entre ces différents variants se fait le plus souvent par électrophorèse sur gel d'agarose à pH acide (pH 6,0), qui permet de séparer l'Hb C de l'Hb E et de l'Hb O, ainsi que l'Hb S de l'Hb D et de l'Hb G (Figure 6). En revanche, les Hb E et Hb O ainsi que les Hb D et Hb G ne peuvent toujours pas être différenciées en combinant ces deux méthodes électrophorétiques (24) (55). De plus, ces techniques présentent l'inconvénient d'être consommatrices de temps et de main d'œuvre. En outre, elles manquent de précision pour la quantification des hémoglobines en concentrations faibles, comme l'Hb A<sub>2</sub>, et pour la détection des variants à migration rapide, comme l'Hb H ou l'Hb Bart's. Il est même maintenant admis que la quantification des variants par densitométrie manque de précision et que ces deux techniques d'électrophorèse doivent être utilisées à visée qualitative. Elles sont donc aujourd'hui le plus souvent utilisées combinées à une autre méthode, principalement la chromatographie liquide de haute performance (CLHP), qui présente une précision bien plus importante (3) (14). En effet, une étude réalisée en 1999 par le College of American Pathologists avait montré un coefficient de variation (CV) de 33,6 % pour les quantifications de l'Hb A<sub>2</sub> à une concentration de 2,41 % par densitométrie à partir des gels électrophorétiques. Par CLHP, le CV était de 4,3 % pour une Hb A<sub>2</sub> à une concentration de 3,47 %. Ainsi, la combinaison de ces techniques d'électrophorèse avec la CLHP permet l'identification et la quantification des hémoglobines, cette dernière étant réalisée par la CLHP uniquement (74) (24).

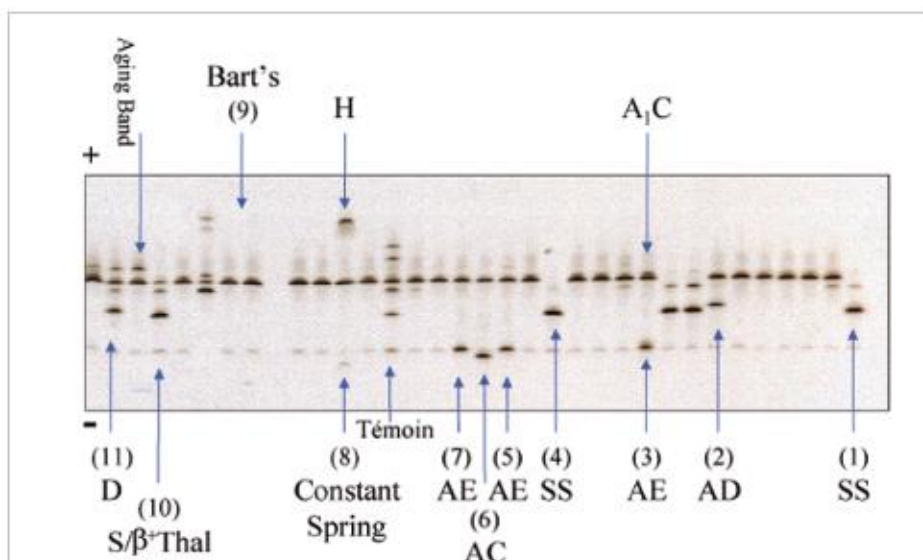


**Figure 5. Electrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin (12).**



**Figure 6. Electrophorèse sur gel d'agar à pH = 6 (12).**

Une autre technique électrophorétique utilisée pour la recherche des anomalies de l'hémoglobine est l'isoélectrofocalisation, encore appelée focalisation isoélectrique (Figure 7). Cette technique, réalisée sur gel d'agarose ou sur gel de polyacrylamide, sépare les hémoglobines dans un gradient de pH en fonction de leur point isoélectrique (24) (32). Pour cela, des ampholytes sont introduits dans le gel de manière à créer un gradient de pH continu sous l'effet d'un champ électrique. Les différentes hémoglobines contenues dans l'échantillon à analyser vont migrer jusqu'à atteindre la région où le pH est égal à leur pH isoélectrique. A cette position, la charge nette est nulle, l'hémoglobine cesse de migrer et focalise en une bande étroite (10). Cette technique, permettant de séparer des variants de l'hémoglobine dont les points isoélectriques diffèrent de 0,02 unités de pH, présente une excellente résolution et s'avère très utile pour détecter les hémoglobines anormales chez le nouveau-né, alors que l'hémoglobine F constitue la fraction hémoglobinique majeure pendant les premiers mois de la vie. De plus, l'isofocalisation électrique est parfaitement adaptée à l'analyse de grandes séries. En revanche, les principales limites de cette méthode sont une mise en œuvre longue et complexe. De ce fait, son utilisation est quasiment réservée au dépistage néonatal des hémoglobinopathies (10) (32).



**Figure 7. Isoélectrofocalisation en gel d'agarose (Isolab®) (12).**

Cependant, ces techniques électrophorétiques manuelles laissent de plus en plus place à l'électrophorèse capillaire, rapide et automatisée. En effet, cette dernière, dont le principe sera décrit plus précisément dans le chapitre II, permet une quantification précise des différentes fractions de l'hémoglobine, semblable à celle de la CLHP (32). Elle est donc aujourd'hui en plein essor et fait l'objet de développements commerciaux importants. Ainsi, Sebia a commercialisé le système Capillarys® en 2001, puis le système Minicap® en 2007, dont nous étudierons les performances dans les prochains chapitres.

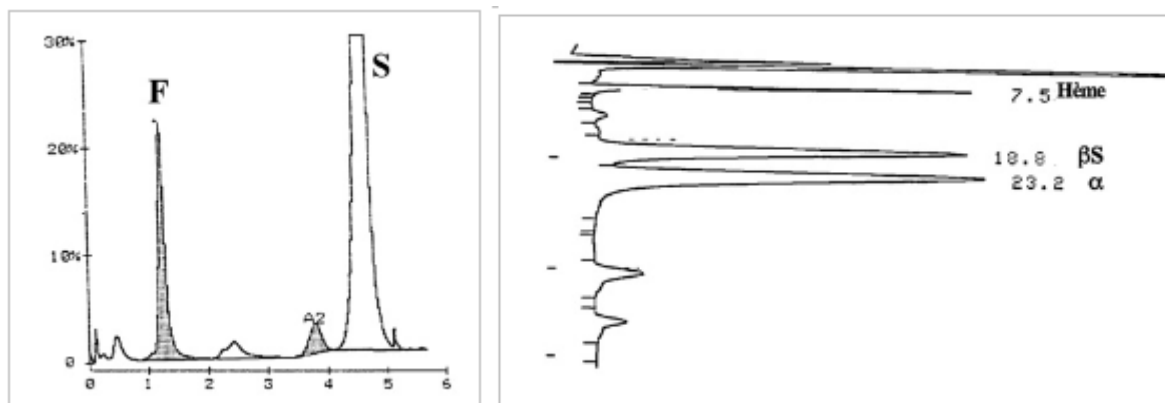
### I.2.1.2. Méthodes chromatographiques

La chromatographie liquide de haute performance a été développée pour permettre à la fois le dépistage et la confirmation des hémoglobinopathies chez les nouveau-nés avec une grande sensibilité et spécificité. En effet, sa bonne sensibilité vis-à-vis des variants majeurs impliqués en pathologie ainsi que sa rapidité de réalisation (environ 3 minutes par échantillon), permettant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons, ont fait de la CLHP une méthode particulièrement adaptée au dépistage des anomalies de l'hémoglobine (74).

Ce temps d'analyse rapide a été possible par la mise au point d'une technique de CLHP par échange de cations (Figure 8). Les différentes hémoglobines sont séparées par un gradient de tampons de force ionique et de pH croissants. Cette technique, automatisée et adaptée à de grandes séries, permet une quantification précise de l'Hb A2, Hb F, Hb A, Hb S et Hb C notamment. Cependant, puisque certains variants de l'hémoglobine peuvent co-éluer et certaines hémoglobines éluent avant la zone d'intégration des pics, cette technique ne peut être utilisée seule (74). Elle doit être couplée à une autre technique, par exemple

électrophorétique, de manière à confronter les résultats obtenus par ces deux techniques différentes (24).

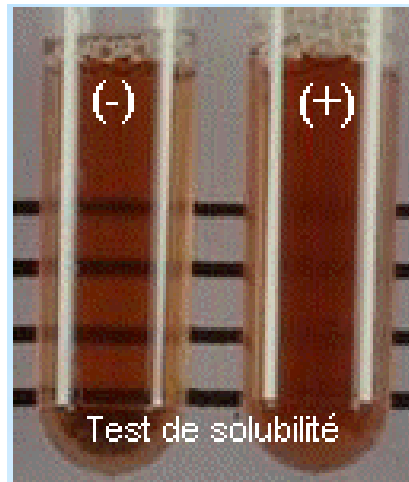
Une autre technique chromatographique est la CLHP en phase inverse, utilisée pour la caractérisation des chaînes de globines (Figure 8). Dans cette technique, les chaînes polypeptidiques sont séparées en fonction de leur hydrophobicité. La CLHP en phase inverse est particulièrement intéressante pour la caractérisation des hémoglobines embryonnaires et fœtales et elle contribue à la séparation et à la quantification de variants rares par l'analyse de leurs chaînes mutantes. De ce fait, elle reste réservée aux laboratoires spécialisés dans l'étude de l'hémoglobine (14).



**Figure 8. Profil chromatographique d'un patient homozygote S/S en CLHP par échange de cations (à gauche) et en CLHP en phase inverse (à droite) (20).**

### I.2.1.3. Techniques hématologiques et biochimiques spécifiques

Le test de solubilité de l'hémoglobine S, également appelé test d'Itano, est réservé à la confirmation de la présence d'hémoglobine S. Ce test manuel est basé sur la précipitation de l'hémoglobine S désoxygénée lorsqu'elle se trouve en solution saline concentrée (Figure 9). Une des limites de cette technique est sa faible sensibilité. En raison du risque de faux négatifs, elle ne doit donc pas être utilisée chez le nouveau-né ou chez un sujet présentant une faible concentration d'hémoglobine S. Il existe également un risque de faux positifs, notamment avec l'hémoglobine H et l'hémoglobine C-Harlem, qui précipitent dans les mêmes conditions. En outre, le test d'Itano est dépendant de la qualité des réactifs (saponine, hydrosulfite de sodium) et des conditions opératoires (température) (14) (73).



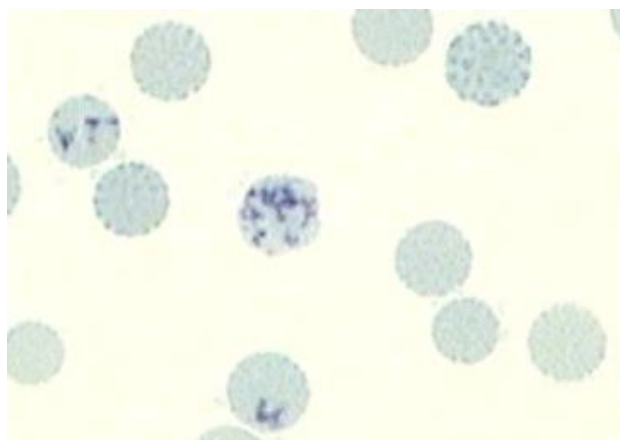
**Figure 9. Test de solubilité de l'hémoglobine S (test d'Itano) (21).**

Le test de falciformation d'Emmel peut représenter une alternative au test d'Itano. Il consiste à mettre en contact, sur une lame, une goutte de sang à analyser avec une goutte de métabisulfite de sodium. En raison de la diminution de solubilité de l'hémoglobine S en condition de désoxygénation, les hématies contenant de l'hémoglobine S changent de forme et subissent une falciformation. Cette technique manque toutefois de sensibilité et de spécificité. Certaines hémoglobines autres que l'hémoglobine S, comme l'hémoglobine C-Harlem, précipitent également lorsqu'elles sont désoxygénées et induisent une falciformation des globules rouges. Le test de falciformation est donc aujourd'hui de moins en moins utilisé (14) (81).

Le test de stabilité à l'isopropanol est quant à lui un examen réservé aux laboratoires spécialisés pour l'étude de l'hémoglobine dans le cadre du diagnostic d'hémoglobine instable. Il consiste à incuber un hémolysat à 37°C dans un tampon contenant 17 % d'isopropanol. Dans un tel milieu apolaire, les forces de cohésion internes de la molécule d'hémoglobine diminuent et celle-ci précipite. Alors que l'hémoglobine A précipite après 50 à 60 minutes à 37°C, les hémoglobines instables précipitent précocément, en 5 à 20 minutes selon les variants. Cette technique présente quelques limites liées à un risque de faux positifs (hémoglobine F, méthémoglobine, chaînes libres (hémoglobine H ou Bart's), précipitation des protéines non héminiques chez des patients ayant une forte réticulocytose) et de faux négatifs, notamment en cas d'hémoglobines hyperinstables. En effet, ces dernières sont très rapidement détruites, dans les minutes ou heures qui suivent leur biosynthèse. Elles ne sont alors pas mises en évidence par ce test mais nécessitent l'utilisation de techniques de biologie moléculaire. En outre, il existe un certain nombre de variants instables *in vitro* et ne s'accompagnant d'aucune anomalie hématologique ou clinique (14) (73).

Les colorations supravitales utilisant un agent oxydant comme le bleu de crésyl brillant ou le violet de méthyl sont également utiles pour le diagnostic d'hémoglobine instable par la mise en évidence des corps de Heinz sur frottis sanguin (Figure 10). Après incubation des

érythrocytes à 37°C, en l'absence de glucose, les corps de Heinz apparaissent comme des inclusions, souvent attachées à la membrane (42) (3).



**Figure 10. Corps de Heinz visibles au bleu de crésyl brillant (15).**

Une autre technique spécifique utilisée autrefois pour le diagnostic des hémoglobinopathies était le dosage de l'hémoglobine F par la méthode de Betke. Celle-ci reposait sur la résistance de l'hémoglobine F à la dénaturation alcaline, ensuite mesurée par spectrophotométrie. Elle est aujourd'hui largement remplacée par la CLHP ou l'électrophorèse capillaire (14) (83).

#### I.2.1.4. Place de la biologie moléculaire

La recherche d'anomalies génétiques de l'hémoglobine a pour but principal de dépister les couples à risque de donner naissance à un enfant malade et, le cas échéant, de réaliser un diagnostic prénatal. En effet, si chacun des deux membres du couple est porteur sain d'une mutation ou d'une délétion d'un gène de globine, il existe un risque sur quatre de transmettre ces deux anomalies à un enfant et que celui-ci présente une hémoglobinopathie. Après identification des sujets porteurs, un conseil génétique doit être prévu afin d'expliquer au couple les risques génétiques relatifs à l'anomalie dépistée et un diagnostic prénatal pourra être envisagé (14) (24) (56).

Plusieurs techniques de biologie moléculaire, réalisées en laboratoires spécialisés, sont disponibles pour le diagnostic prénatal des hémoglobinopathies. En France, six laboratoires regroupés sous la forme d'un réseau « Pathologie héréditaire de l'érythrocyte » subventionné par la Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins (DHOS) effectuent ces analyses moléculaires spécialisées (3). Les méthodes classiques de biologie moléculaire sont réalisées à partir de l'ADN fœtal extrait des cellules amniotiques, de biopsies de placenta ou de biopsies de villosités chorales. Les types de mutations et leur distribution dans les

différentes populations étant maintenant bien connus, la plupart des méthodes sont basées sur la mise en évidence directe de la mutation responsable de l'hémoglobinopathie (24) (14).

Ainsi, la majorité des variants de l'hémoglobine et des  $\beta$ -thalassémies est due à des mutations ponctuelles (y compris les insertions et délétions courtes), classiquement mises en évidence par séquençage des gènes  $\alpha$  et  $\beta$ -globine (3). Cependant, cette technique s'avère également utile pour l'identification des variants rares. En effet, puisque les gènes de globine sont de petite taille, leur séquençage est réalisable relativement rapidement et permet de mettre en évidence l'anomalie moléculaire, même si elle est rare (14) (24) (44).

Différentes techniques de PCR (Polymerase Chain Reaction) peuvent aussi être utilisées pour la recherche d'une mutation connue, comme la RFLP-PCR, la PCR en temps réel avec révélation par sondes fluorescentes spécifiques ou encore la technique de reverse dot-blot (3) (57) (43).

Classiquement, les délétions larges à l'origine des syndromes  $\alpha$ -thalassémiques sont recherchées par la technique de Gap-PCR (93) (44). D'autres techniques comme la MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) sont actuellement de plus en plus utilisées pour le criblage des délétions rares ou non encore décrites (3) (35) (78).

### I.2.2. Stratégie diagnostique des hémoglobinopathies au CHU de Nancy avant l'implantation du système Minicap<sup>®</sup> (Sebia)

Avant l'installation de l'automate d'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> au laboratoire d'hématologie au CHU de Nancy, la recherche des anomalies de l'hémoglobine reposait sur l'utilisation d'une technique d'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin (plaques Helena BioSciences, TITAN III-H ; tampon SUPRE HEME buffer) couplée à une technique de chromatographie liquide de haute performance (analyseur D-10<sup>®</sup>, BioRad). En cas de suspicion d'anomalie de l'hémoglobine telle la présence d'hémoglobine C, E, O ou d'hémoglobine S, D ou G, une technique d'électrophorèse sur gel d'agarose à pH acide (Kit Hydragel acid(e) hemoglobin(e) K20, SEBIA), complémentaire de l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin, était réalisée afin d'identifier le ou les éventuel(s) variant(s) de l'hémoglobine présent(s) dans l'échantillon. En outre, en cas de suspicion de drépanocytose, le test d'Itano était mis en œuvre pour confirmer la présence d'hémoglobine S.

### I.2.3. Prise en charge de la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine par l'Assurance Maladie

Dans la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (septembre 2014), il est précisé pour l'acte codé 1120 : « 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 » (5). Cela doit donc guider les biologistes pour l'établissement de leur stratégie relative à la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine.

Dans ce contexte, le réseau DHOS « Pathologie héréditaire de l'érythrocyte » (3) recommande d'utiliser en première intention la CLHP par échange de cations ou l'électrophorèse capillaire automatisées, ces deux techniques permettant une quantification fiable de l'Hb A2. Ce groupe de travail recommande de choisir les deux autres tests phénotypiques parmi les suivants : électrophorèse de l'hémoglobine à pH alcalin ou acide, focalisation isoélectrique, test d'Itano (solubilité en milieu réduit spécifique de la mutation  $\beta^S$ ) ou CLHP en phase inverse des chaînes de globine. Ces deux autres tests ont pour but de caractériser de façon certaine les variants les plus fréquents (Hb S, Hb C, Hb E) et de permettre le dépistage d'un variant rare de l'hémoglobine non détecté par la technique initiale. Le groupe de travail précise que lorsqu'un laboratoire ne dispose pas d'un tel panel de techniques, « il devrait idéalement envoyer le prélèvement, avec toutes les données cliniques et biologiques disponibles, à un laboratoire équipé et ne pas rendre de conclusion à partir d'un test unique. »

## **II. L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE POUR LE DIAGNOSTIC DES HEMOGLOBINOPATHIES**

### **II.1. CHOIX DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE POUR LE DIAGNOSTIC DES HEMOGLOBINOPATHIES AU CHU DE NANCY**

#### **II.1.1. Arguments pour l'implantation de l'électrophorèse capillaire**

Le Service d'Hématologie Biologique (SHB) du CHU de Nancy utilisait jusqu'alors la chromatographie liquide de haute performance, méthode quantitative, couplée à l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin, méthode qualitative. Or, cette dernière technique présentait un certain nombre d'inconvénients.

En effet, s'agissant d'une technique manuelle, elle est relativement longue à réaliser et présente un risque d'erreur plus important qu'une méthode automatisée. En outre, l'interprétation est visuelle, opérateur-dépendant, donc peu reproductible et de fiabilité relative. De plus, cette technique d'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin n'est pas adaptée pour les hémoglobines en faible proportion telles que l'Hb A2 et l'Hb F.

D'autre part, elle manque de résolution puisqu'elle ne permet pas la discrimination de toutes les fractions de l'hémoglobine : ainsi, les hémoglobines A2, C, O et E migrent au même endroit, de même que les hémoglobines S, D et G. La suspicion de tels variants d'hémoglobine anormaux nécessitaient alors la mise en œuvre d'une seconde technique manuelle : l'électrophorèse à pH acide en gel d'agar. Cependant, elle ne permettait tout de même pas de séparer l'hémoglobine E de l'hémoglobine O et l'hémoglobine D de l'hémoglobine G notamment (74) (4).

De plus, l'électrophorèse capillaire apporte une quantification des différentes fractions de l'hémoglobine séparées, ce qui est intéressant notamment pour les cas où la chromatographie liquide de haute performance ne permettrait pas de les séparer et de les quantifier précisément.

Il a donc semblé opportun de remplacer l'usage de la technique manuelle d'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin par l'électrophorèse capillaire, méthode automatisée offrant un temps d'analyse plus court, un risque d'erreur très faible, une meilleure résolution et une meilleure reproductibilité.

En outre, il est important de signaler que cette nouvelle stratégie diagnostique continue de satisfaire à la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale qui précise que la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine nécessite le recours à au moins une technique d'électrophorèse, et deux autres tests adaptés selon les besoins pour un résultat diagnostique d'orientation (5).

### II.1.2. Nouvelle approche diagnostique des hémoglobinopathies au CHU de Nancy

L'étude de l'hémoglobine au SHB du CHU de Nancy se fait en première intention systématiquement par la chromatographie liquide de haute performance D-10<sup>®</sup> BioRad et l'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> Sebia. Ce sont deux méthodes séparatives et quantitatives de l'hémoglobine.

Pour chaque patient, les données obtenues sont interprétées en regard des renseignements cliniques, des valeurs de l'hémogramme, du frottis sanguin et du bilan martial éventuel. Les paramètres érythrocytaires considérés sur l'hémogramme sont principalement la numération des hématies, le taux d'hémoglobine, le volume globulaire moyen (VGM), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH). Sur le frottis, la morphologie des hématies est observée. Certaines anomalies morphologiques sont en effet évocatrices d'anomalies de l'hémoglobine : drépanocytes, cellules cibles, présence d'une anisocytose et d'une poïkilocytose.

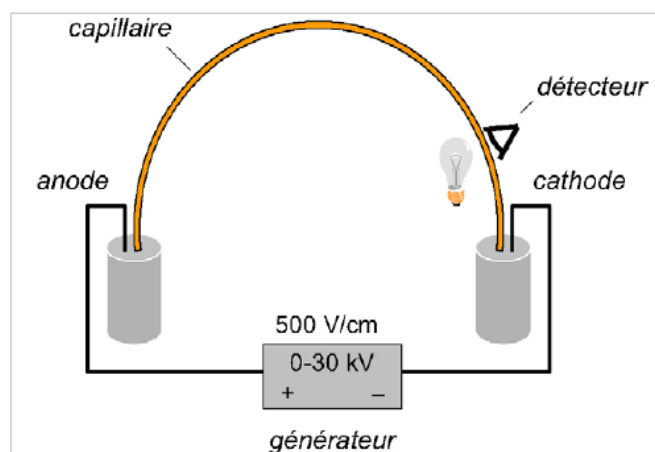
En cas de suspicion d'hémoglobine S, le test d'Itano peut être réalisé pour confirmation.

Dans les cas de suspicion d'un variant rare de l'hémoglobine, l'échantillon est envoyé dans un laboratoire de référence (CHU Henri Mondor de Créteil) pour expertise.

## II.2. PRINCIPE DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

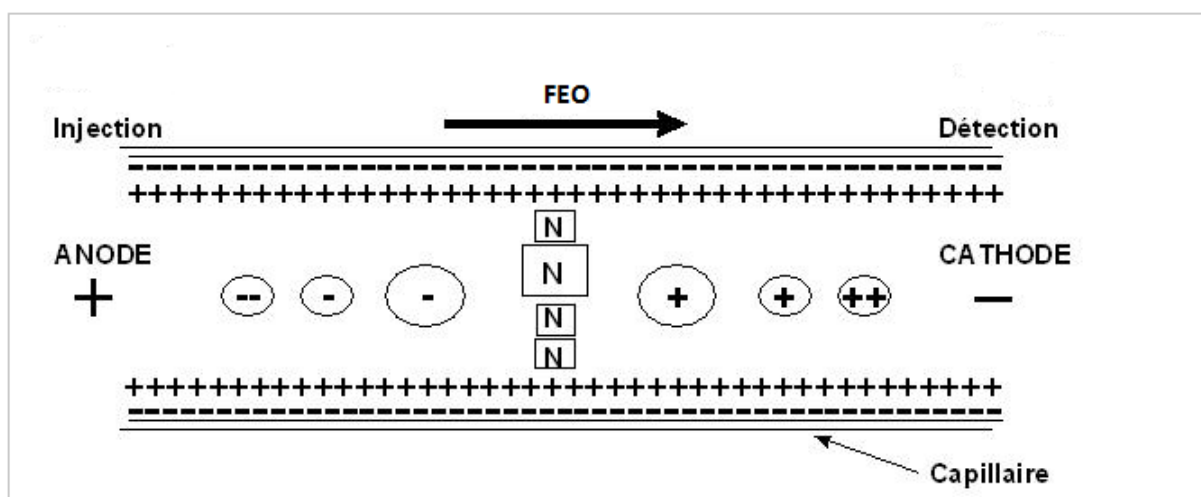
L'invention de l'électrophorèse capillaire remonte à la fin des années 1960, quand Hjertén puis Everaerts et Keulemans réussirent à contrôler les problèmes de convection, liés à l'effet Joule et rencontrés en électrophorèse sur support solide, en réalisant l'électrophorèse dans des tubes en Téflon (32) (18).

Classiquement, l'électrophorèse capillaire est pratiquée dans un capillaire de silice fondue recouvert d'une couche de polyimide de 20 à 200  $\mu\text{m}$  de diamètre interne et de 20 à 200 cm de longueur. Le capillaire, placé dans un système de thermostatisation, est rempli d'une solution tampon et plonge dans deux réservoirs contenant cette même solution. Chaque réservoir est connecté à une électrode reliée à un générateur de courant. Une forte différence de potentiel (plusieurs milliers de volts) est appliquée aux bornes de chaque capillaire pour séparer les molécules sur la base de leur rapport charge/masse. L'appareillage comporte également un système de détection, le plus souvent un spectrophotomètre UV-visible, en lien avec la longueur d'onde d'absorption spécifique des hémoglobines à 415 nm (Figure 11) (32) (24) (18).



**Figure 11. Représentation schématique d'un appareillage d'électrophorèse capillaire (32).**

Cette technique, basée sur une séparation électrocinétique, est caractérisée par l'interface solide-liquide entre la paroi du capillaire en silice et l'électrolyte qui le remplit. En fonction du pH du tampon, les groupements silanols de la silice s'ionisent, conférant à la paroi des charges négatives à l'origine du flux électro-osmotique, plus ou moins important, orienté vers la cathode. D'autre part, chaque molécule chargée est caractérisée par sa propre mobilité électrophorétique dans un tampon de pH donné, celle-ci étant fonction de la charge, taille et forme de la molécule et de la viscosité du tampon. Dans un tampon de pH donné, les molécules chargées sont alors séparées en fonction du flux électrophorétique, dépendant de la mobilité électrophorétique de la molécule et du champ électrique appliqué, et en fonction du flux électro-osmotique (Figure 12) (32) (18).



**Figure 12. Principe de l'électrophorèse capillaire, caractérisée par la présence du flux électro-osmotique à l'interface entre la paroi du capillaire et le tampon (59).**

L'électrophorèse capillaire a connu un développement important et a donné naissance à toute une famille de techniques telles que l'isotachophorèse capillaire, l'électrophorèse capillaire en zone et la focalisation isoélectrique capillaire notamment (32).

Ainsi, les premières analyses de l'hémoglobine par électrophorèse capillaire ont été réalisées en 1975 par Arlinger qui a mis au point une technique d'isotachophorèse (6). Dans cette technique, le capillaire est rempli par un électrolyte meneur de mobilité plus élevée que celle des analytes et un électrolyte terminal de mobilité plus faible. L'échantillon est placé entre ces deux tampons et les analytes se séparent en bandes en fonction de leur mobilité électrophorétique. Cependant, les séparations obtenues présentaient l'inconvénient de ne pas être suffisantes, complètes. De ce fait, peu de méthodes utilisant ce principe ont fait l'objet de publications (6) (32).

Par la suite, l'électrophorèse capillaire en zone, classique, a beaucoup plus été étudiée et utilisée pour le diagnostic des hémoglobinopathies. Ainsi, dès 1991, Chen a réalisé la séparation des hémoglobines A, S et C par électrophorèse capillaire en zone à pH alcalin (8,6) avec des résultats comparables voire supérieurs à ceux obtenus sur support solide, dans des temps d'analyse relativement courts (8 minutes) (23). D'autres méthodes similaires ont été ensuite évaluées. Par exemple, Jenkins a développé une méthode comparable en termes de capillaire et de pH permettant une détection et une quantification satisfaisante des hémoglobines S, D et E, sans toutefois parvenir à séparer l'hémoglobine F de l'hémoglobine A (52) (32). En 1999, l'équipe de Cotton, de même que Mario *et al.*, a montré qu'un recouvrement dynamique des parois du capillaire par des polymères chargés permettait d'obtenir une séparation très reproductible et très rapide (5 minutes) des variants les plus courants (63) (68).

Une autre technique d'électrophorèse capillaire, la focalisation isoélectrique capillaire, a ensuite été mise au point par de nombreuses équipes au début des années 1990 (32). Il s'agit de l'une des méthodes les plus résolutive sur support solide, permettant d'excellentes séparations dans des temps d'analyses raisonnables. Le principe général de cette méthode consiste en une focalisation de l'hémoglobine dans une solution d'ampholytes créant un gradient de pH de 3 à 10 dans un capillaire neutre, avec recouvrement permanent des parois. Parmi les équipes ayant développées cette méthode, on peut citer Zhu et Molteni (70). Ceux-ci ont montré la séparation de variants courants (Hb S, Hb C, Hb E, Hb G Philadelphia) ainsi que celle d'hémoglobines anormales associées aux  $\alpha$ -thalassémies (Hb H, Hb Bart's). D'autres équipes ont obtenu des résultats similaires, dont Mario *et al.* (67), ainsi que Hempe *et al.* qui a également étudié la séparation de variants plus rares et a mis en évidence certaines limites de la méthode, comme par exemple une mauvaise séparation des Hb E, Hb C-Harlem et Hb O-Arab (47) (46).

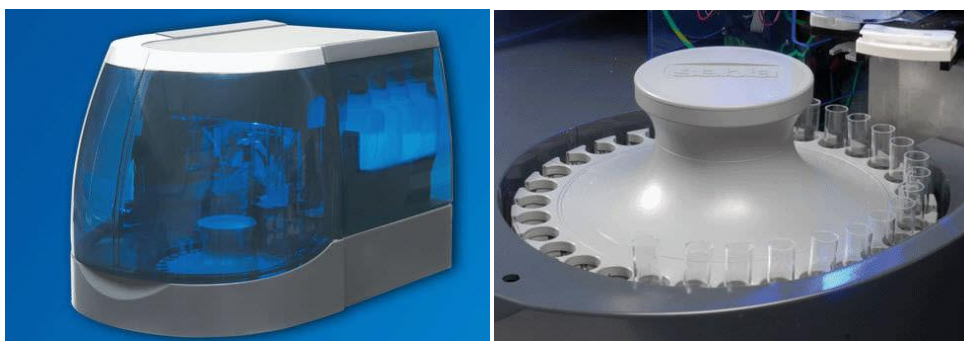
L'électrophorèse capillaire s'est donc rapidement imposée comme méthode de choix, au même titre que la CLHP, pour l'étude des hémoglobinopathies. De plus, elle présente un intérêt économique : bien que le coût matériel soit comparable à celui de la CLHP, les dépenses en réactifs sont nettement moindres. En effet, le prix d'un capillaire est très inférieur à celui d'une colonne de chromatographie et les volumes de tampon utilisés sont bien plus

faibles, de l'ordre de 1000 fois moins (32). Ses performances analytiques, combinées à un coût raisonnable, ont contribué au développement rapide du système d'électrophorèse capillaire en zone Minicap<sup>®</sup> commercialisé par Sebia, fondé sur la même technologie que l'appareil Capillarys<sup>®</sup>.

## II.3. FONCTIONNEMENT DU SYSTEME MINICAP<sup>®</sup> (SEBIA)

### II.3.1. Matériel et réactifs

L'automate Minicap<sup>®</sup> (Figure 13) assure l'analyse des hémoglobines sur 2 capillaires en parallèle, permettant 2 migrations simultanées. Il s'agit de capillaires en silice fondue de diamètre interne inférieur à 100 µm. Les échantillons à analyser sont placés sur un carrousel (Figure 13), ce dernier comportant 28 positions.



**Figure 13. Système d'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> (Sebia) et son carrousel à 28 positions.**

Les kits MINICAP HEMOGLOBIN(E) fournissent différents réactifs nécessaires à l'analyse :

- tampon basique (pH 9,4)
- solution hémolysante, pour dilution et hémolyse des hématies
- solution de lavage
- cupules réactif
- filtres, pour filtration du tampon, de la solution de lavage et de l'eau distillée ou déminéralisée
- boîtes pour cupules usagées, permettant la récupération automatique des cupules réactif usagées
- étiquettes code-barres pour identification de la solution hémolysante.

Bien que non fourni dans le kit MINICAP HEMOGLOBIN(E), un contrôle Hb A2 Normal est également nécessaire. Il est obtenu à partir d'un pool de sangs humains normaux et est conservé sous forme lyophilisée. Ce réactif est utilisé comme contrôle de migration avant toute nouvelle série d'analyses. Le contrôle Hb A2 Normal sert aussi de contrôle de qualité de la méthode de dosage de l'hémoglobine humaine A2. Il est pour cela recommandé d'inclure ce contrôle dans chaque série d'analyses.

D'autres contrôles internes de la qualité sont également utilisés sur Minicap<sup>®</sup> : le contrôle Hb AFSC, qui comme son nom l'indique, contient des hémoglobines A, F, S et C ainsi que le contrôle Hb A2 Pathologique, contenant de l'hémoglobine A2 à un taux supérieur aux valeurs de référence. Il est recommandé d'inclure, pour chaque série d'analyses, un contrôle interne de la qualité, que ce soit le contrôle Hb AFSC, le contrôle Hb A2 Normal ou le contrôle Hb A2 Pathologique. En pratique, au laboratoire d'hématologie du CHU de Nancy, le contrôle Hb A2 Normal est analysé avant la série des échantillons de patients et le contrôle Hb AFSC ou le contrôle Hb A2 Pathologique, en alternance, est analysé à la fin de la série des échantillons de patients. Aussi, le contrôle Hb A2 Normal est analysé en double afin de tester les 2 capillaires de migration.

### II.3.2. Echantillons analysés

L'électrophorèse capillaire de l'hémoglobine par Minicap<sup>®</sup> se fait sur culot globulaire obtenu à partir de sang frais prélevé sur anticoagulant EDTA. La préparation du culot globulaire est réalisée par centrifugation du tube de sang total pendant 5 minutes à 5000 tr/min, élimination du maximum de plasma, lavage des globules rouges par de l'eau physiologique à deux reprises et élimination de l'excès d'eau physiologique à la surface du culot globulaire lavé. Il existe un système de « cap piercing » permettant l'analyse en sang total (41), mais dont l'automate au CHU Nancy n'est pas équipé.

Les échantillons de sang total peuvent être conservés au maximum 7 jours entre 2 et 8°C, puisqu'au-delà de ce délai, la dégradation des hémoglobines dans l'échantillon risque d'être trop importante. Dans un échantillon conservé plus de 7 jours à 4°C, certaines fractions liées à une dégradation de l'échantillon apparaissent. Ainsi, une faible fraction correspondant à de la méthémoglobine apparaît dans la zone de migration de l'Hb S. En présence d'Hb A, une fraction correspondant à de l'Hb A dégradée apparaît en position anodique par rapport à l'Hb A. En présence d'Hb F, notamment dans les échantillons de nouveau-nés, une fraction apparaît dans la zone de migration de l'Hb A. En présence d'Hb S, une fraction d'Hb S dégradée se retrouve dans la zone de migration de l'Hb F. L'Hb C dégradée apparaît en position anodique par rapport à l'Hb A2, sans toutefois interférer avec celle-ci. Quant à l'Hb O-Arab dégradée, elle migre dans la zone de l'Hb S. Le profil électrophorétique d'un échantillon ayant subi une dégradation est donc ininterprétable, d'où l'importance du respect de la procédure pré-analytique. De plus, des agglomérats visqueux entre les érythrocytes peuvent apparaître dans des échantillons de sang vieilli ou mal conservé et perturber l'hémolyse des échantillons par la solution hémolysante. Si l'analyse ne peut pas être réalisée dans un délai de 7 jours, les échantillons de culots globulaires lavés doivent alors être conservés rapidement, au maximum dans les 8 heures suivant le prélèvement, à - 80°C. Dans ces conditions, les échantillons congelés sont stables au maximum 3 mois. Cependant, en pratique au laboratoire, du fait de l'activité (1 à 2 séries par semaine), les échantillons sont analysés relativement rapidement et ce cas de figure ne se présente que très rarement.

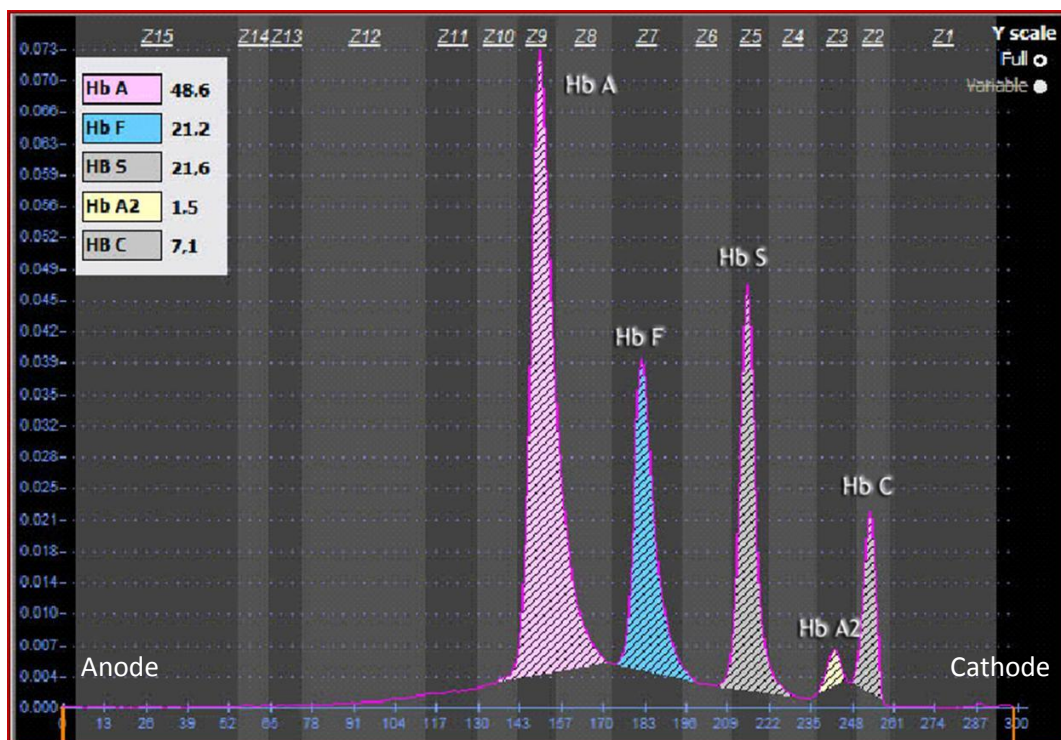
### II.3.3. Technique analytique

La méthode d'électrophorèse capillaire Sebia fait intervenir plusieurs étapes. Tout d'abord, les tubes primaires contenant les culots globulaires préparés précédemment sont placés sur le carrousel en positions 1 à 26. Les tubes doivent être débouchés et les codes-barres placés face à la fenêtre de lecture. Si le nombre d'échantillons à analyser est impair, un tube contenant de l'eau distillée ou déminéralisée doit suivre le dernier tube échantillon, du fait de la présence des deux capillaires. Un tube à hémolyse contenant de la solution hémolysante est placé en position 27. La position 28 est destinée à recevoir le tube contenant le contrôle Hb A2 Normal, utilisé comme contrôle de migration. Les contrôles internes de la qualité (contrôle Hb AFSC, contrôle Hb A2 Normal et contrôle Hb A2 Pathologique) peuvent être placés en position 1 à 26 et sont traités comme des échantillons de patients. Après la mise en place du carrousel dans le système Minicap<sup>®</sup>, l'automate procède à la lecture des codes-barres des tubes primaires échantillons et du carrousel. Les échantillons sont ensuite hémolysés et dilués par la solution hémolysante dans les cupules réactif, avec rinçage de l'aiguille de prélèvement entre chaque dilution. Un lavage des capillaires a lieu avant injection des échantillons hémolysés dans ces capillaires, l'injection s'effectuant à l'anode par aspiration. Les différentes fractions d'hémoglobine migrent alors dans les capillaires en milieu basique (pH 9,4), permettant leur séparation et leur détection directe à la cathode. La migration, qui dure environ 8 minutes, se fait à voltage constant élevé (plusieurs milliers de volts) et à température régulée par effet Peltier. La lecture des différents pics d'hémoglobine est réalisée à 415 nm, correspondant à la longueur d'onde d'absorption maximale de l'hémoglobine. Toutes ces étapes aboutissent à l'obtention de tracés ou profils électrophorétiques qui seront ensuite interprétés par le biologiste.

## II.4. INTERPRETATION DES PROFILS ELECTROPHORETIQUES

A la fin de l'analyse, les profils électrophorétiques s'affichent sur le logiciel Phoresis<sup>®</sup> fourni par la société Sebia, où ils font l'objet d'une interprétation visuelle à la recherche d'éventuelles anomalies. Une quantification relative des différentes fractions de l'hémoglobine est automatiquement réalisée. Afin de faciliter l'interprétation des profils électrophorétiques, le pic d'hémoglobine A est positionné au centre de la fenêtre de reprise. Les pics d'Hb A, Hb A2, Hb F, Hb S et Hb C sont identifiés de façon automatique. Les positions des autres variants de l'hémoglobine sont repérées à l'écran au sein de zones allant de Z1 à Z15 (Figure 14). Une liste des variants connus potentiellement présents dans chaque zone (Annexe 1) apparaît lorsque l'on place le curseur sur cette zone en haut de l'écran.





**Figure 14. Profil électrophorétique visualisé sur le logiciel Phoresis®, avec identification automatique des pics d'Hb A, Hb A2, Hb F, Hb S et Hb C et découpage en 15 zones de migration.**

Lors de l'analyse d'échantillons dépourvus d'Hb A, le profil ne pouvant pas être recentré sur le pic d'Hb A, le recentrage se fait par rapport au pic d'Hb A des deux derniers profils obtenus sur le même capillaire. Les zones de migration Z1 à Z15 ne sont pas repérées à l'écran et aucun pic ne peut être identifié (Figure 15). Dans ce cas de figure, il est recommandé de répéter l'analyse en mélangeant volume à volume le culot globulaire de l'échantillon à analyser avec le contrôle Hb A2 Normal. Ce dernier, comportant de l'Hb A, va permettre le recentrage du profil électrophorétique et, par conséquent, le positionnement correct du ou des variants de l'hémoglobine au niveau de la zone de migration correspondante. Alors que cette seconde analyse est utile pour l'identification des différents pics d'hémoglobine présents dans l'échantillon à analyser, la quantification des fractions n'a en revanche aucune signification du fait de la dilution. Celle-ci est réalisée à partir de la première analyse de l'échantillon, non dilué dans le contrôle Hb A2 Normal. Par ailleurs, afin de réduire les coûts d'analyse, il est également envisageable de remplacer cet échantillon de contrôle par un échantillon provenant d'un patient et présentant un profil électrophorétique normal connu (Figure 16).

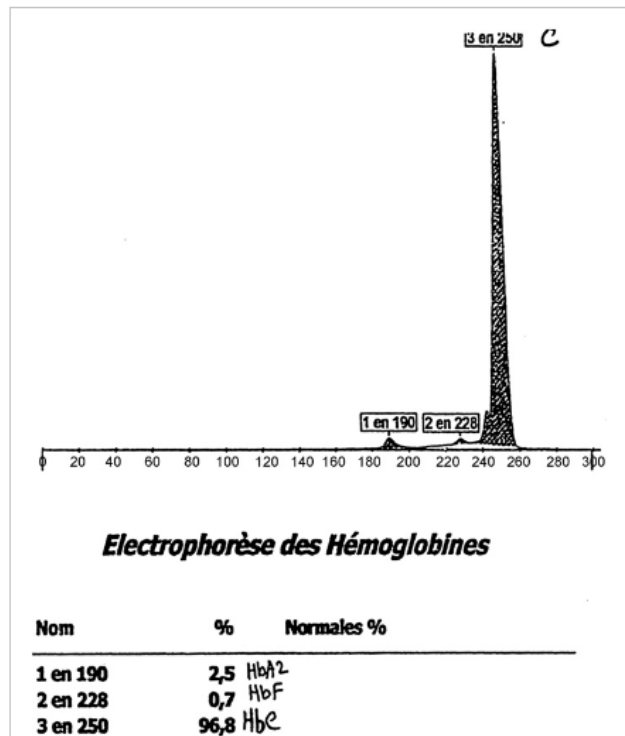


Figure 15. Electrophorèse capillaire de l'hémoglobine d'un patient homozygote C/C (72).

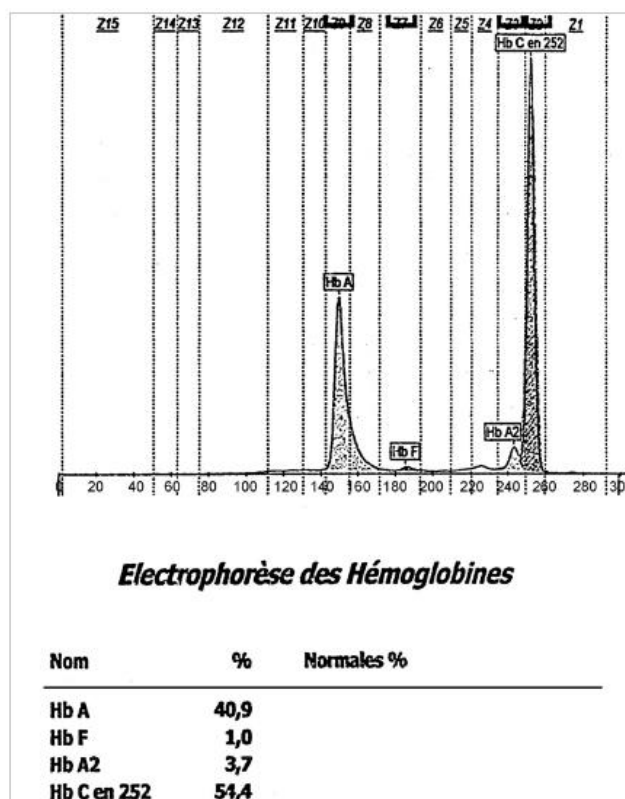


Figure 16. Electrophorèse capillaire de l'hémoglobine d'un mélange échantillon du patient homozygote C/C avec échantillon d'un patient adulte normal (72).

Les profils électrophorétiques de sangs normaux, à l'âge adulte (Annexe 2), montrent la présence d'une majorité d'Hb A et d'une faible proportion d'Hb A2, de l'ordre de 2,2 à 3,2 %. Une faible fraction d'Hb F est parfois retrouvée, dans ce cas en pourcentage inférieur à 1 %. En revanche, chez les nouveau-nés, les profils électrophorétiques normaux présentent une majorité d'Hb F (Annexe 3). La proportion d'Hb F ne cesse de diminuer durant les premiers mois de vie, au profit de l'Hb A dont la proportion augmente parallèlement (Annexe 4), jusqu'à atteindre vers l'âge de 2 ans un profil électrophorétique de type adulte.

Les principaux variants de l'hémoglobine d'intérêt médical ou anthropologique présentent une charge électrique globale modifiée suite au remplacement d'un acide aminé par un autre, résultant lui-même d'une mutation, délétion ou insertion de nucléotides. Leur séparation des autres fractions de l'hémoglobine et leur identification sont rendues possibles par électrophorèse du fait de cette modification de charge.

Ainsi, l'Hb S, résultant d'une mutation  $\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$ , présente un point isoélectrique plus élevé que celui de l'Hb A et, par conséquent, une charge négative globale plus faible au pH de l'analyse. Elle migre donc en position cathodique par rapport à l'Hb A. Par la technique d'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup>, en tampon alcalin, elle migre entre les fractions d'Hb A et d'Hb A2, à environ un tiers de la distance A2 - A, dans la zone Z5 (Annexe 5).

Concernant l'Hb C, due à la mutation  $\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Lys}$ , son point isoélectrique est encore plus augmenté que celui de l'Hb S. L'Hb C migre alors plus rapidement que l'Hb A et que l'Hb A2, dont elle est parfois partiellement séparée (notamment dans les hémoglobinoses C homozygotes) (Annexe 6).

L'Hb E, dans laquelle un acide glutamique en position 26 de la chaîne  $\beta$  est remplacé par une lysine, migre quant à elle juste après l'Hb A2, dont elle est totalement séparée (Annexe 7).

L'Hb O-Arab fait suite au remplacement d'un acide glutamique en position 26 de la chaîne  $\beta$  par une lysine. L'Hb O-Arab et l'Hb A2 migrent dans la même zone et ne peuvent donc pas être quantifiées. Cependant, lorsque cette fraction est supérieure à 9 %, la présence d'Hb O-Arab peut être suspectée.

L'Hb D (appelée D-Punjab, D-Los Angeles, D-Chicago ou encore D-Portugal) est la conséquence du remplacement d'un acide glutamique en position 121 de la chaîne  $\beta$ -globine par une glutamine. En raison de la modification de charge électrique globale qui en résulte, elle migre au niveau de la zone Z6 (Annexe 8), en position anodique par rapport à l'Hb S.

Outre les anomalies qualitatives de l'hémoglobine caractérisées par la présence anormale d'un variant, la technique d'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> permet également de mettre en évidence les thalassémies, anomalies quantitatives de l'hémoglobine.

Ainsi, en présence d'un trait  $\beta$ -thalassémique, le profil électrophorétique montre une augmentation du pourcentage d'Hb A2 (Annexe 9). La proportion d'Hb F est normale ou légèrement augmentée. Les  $\beta$ -thalassémies homozygotes montrent quant à elles un profil

électrophorétique avec augmentation de la proportion d'Hb F, la proportion d'Hb A2 étant variable.

Dans les  $\alpha$ -thalassémies, caractérisées par la diminution de synthèse des chaînes  $\alpha$ , l'Hb Bart's, correspondant à un tétramère  $\gamma_4$ , peut être mise en évidence à la naissance sur le tracé électrophorétique (Annexe 10). Elle est ensuite remplacée par l'Hb H, correspondant à un tétramère  $\beta_4$ . Du fait de son point isoélectrique relativement bas, celle-ci migre en position beaucoup plus anodique que l'Hb A, au niveau de la zone Z15 (Annexe 11).

Les principaux variants responsables d'hémoglobinopathies sont donc détectables par le système d'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> Sebia. Cependant, dans le « manuel utilisateur » MINICAP HEMOGLOBIN(E), le fournisseur alerte sur le fait que, « compte tenu des principes analytiques des techniques actuelles (principes de l'électrophorèse de zone, résolution), aucune garantie ne peut être donnée quant à la détection totale de tous les variants de l'hémoglobine » (Annexe 1).

### **III. EVALUATION DU SYSTEME MINICAP<sup>®</sup> (SEBIA)**

#### **III.1. ANALYSE DE RISQUES**

Avant de procéder à une vérification de méthode, il est indispensable de réaliser une analyse des risques. En effet, de nombreux facteurs peuvent influencer l'exactitude et la fiabilité d'un résultat. Il est donc nécessaire de connaître les risques afin de mettre en œuvre des éléments de maîtrise de ces risques. Une analyse des risques par la méthode 5M permet d'être exhaustif sur tous les facteurs qui pourraient avoir un impact sur le résultat. Les 5M à étudier correspondent à : Main d'œuvre, Matériel, Matière, Méthode et Milieu. Cette analyse de risques relative à la recherche d'anomalies de l'hémoglobine par électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup>, ainsi que les moyens de maîtrise correspondants, sont consignés dans le tableau suivant :

**Tableau IV. Analyse et gestion des risques relatifs à la technique d'électrophorèse de l'hémoglobine par le système Minicap®.**

5M	Points critiques à maîtriser	Modalités
Main d'oeuvre	Préparation du culot globulaire Erreur d'identification patient	Formation et habilitation du personnel Expérience Mode opératoire présent à la paillasse Gestion des non-conformités
Matière	Tube inapproprié, volume insuffisant Délai et conditions de conservation avant traitement non respectés Mauvaise conservation des réactifs et CIQ (péremption, dégradation...)	Connaissance du manuel de prélèvement Habilitation du personnel CIQ et EEQ Mode opératoire Gestion des réactifs / Péremption suivie
Matériel	Pannes de l'automate Défaut de performances de l'instrument de mesure (fidélité, justesse, dérive, contamination...)	Maintenances Mode opératoire à la paillasse CIQ et EEQ Vérification de méthode Etude de corrélation
Méthode	Défaut de performances (migration, détection, positionnement et intégration des pics)  Erreur de transmission informatique (pertes de données, données erronées, panne)	Vérification de méthode Corrélation avec d'autres techniques (CLHP...) CIQ et EEQ Mode opératoire  Double sauvegarde Contrôle de transfert de résultats Procédure de validation du système informatique de laboratoire (SIL)
Milieu	Température Hygrométrie Altitude Propreté Exposition à une lumière directe Exposition à une source de chaleur directe	Fenêtres fermées Température ambiante et hygrométrie maîtrisées Locaux propres, non poussiéreux Installation à distance d'autres automates ou matériels

## III.2. EVALUATION DES PERFORMANCES

### III.2.1. Paramètres à évaluer

La méthode d'étude des hémoglobinopathies par électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> (Sebia, France) est une méthode normalisée reconnue puisqu'elle utilise une méthode, un équipement et des réactifs dans les conditions préconisées par le fournisseur. Il s'agit donc d'adopter un dispositif médical de diagnostic *in vitro* marqué CE dans le cadre d'une portée flexible standard A (28). Nous devons donc vérifier les performances du couple automate/réactifs annoncées par le fabricant et nous assurer de la validité des résultats en regard des besoins du laboratoire exprimés au préalable (86) (62) (60).

La vérification des performances d'une méthode inclut trois étapes :

- Une étude bibliographique
- La détermination des critères de performance pertinents et le choix des limites d'acceptabilité correspondantes
- La réalisation des vérifications expérimentales sur site

L'électrophorèse capillaire des hémoglobines par le système Minicap<sup>®</sup> est une méthode quantitative puisque, même si les résultats sont exprimés en pourcentages, elle fournit un résultat chiffré sur une échelle continue à partir de la mesure d'un signal en relation directe avec une quantité donnée de l'analyte.

Dans le cas d'une vérification quantitative de méthode en portée flexible standard A, différents paramètres (Tableau V) doivent être vérifiés par recherche bibliographique et/ou par vérification sur site avant la mise en application de la méthode (SH GTA 04).

Tableau V. Eléments à vérifier par bibliographie et/ou vérification sur site en portée flexible A (25).

PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A
<b>Spécificité analytique</b>	Oui	Non
<b>Fidélité</b> (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Oui	Oui
<b>Justesse</b> (approche de la)	Oui	Oui, dès que possible
<b>Intervalle de mesure</b> (Limite de quantification et limites de linéarité)	Oui	A vérifier si nécessaire <sup>4</sup>
<b>Incertitudes/facteurs de variabilité</b> et évaluation	Oui	Oui
<b>Contamination</b> entre échantillons (s'il y a lieu)	Oui	Oui, pour les paramètres sensibles
<b>Stabilité réactifs</b> (après ouverture, embarqués)	Oui	Non
<b>Robustesse</b>	Non	Non
<b>Interférences</b> (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments)	Oui	à vérifier si nécessaire <sup>5</sup>
<b>Intervalle de référence</b> « ex-valeurs normales »	Oui	à vérifier dès que possible, si justifié
Comparaison avec une méthode de référence	Oui (si existe)	Non
Comparaison avec méthode déjà utilisée au LBM ou autre méthode du LBM (appareil en miroir, EBMD) <sup>6</sup>	Oui (si existe)	Oui (si possible)
<b>Analyse des discordances</b> <sup>7</sup>	Oui	Oui

<sup>4</sup> Pour des techniques avec une zone étendue de valeurs possibles.

<sup>5</sup> Pour confirmer ou en cas d'interférences non décrites.

<sup>6</sup> Appareils en miroir : privilégier les appareils utilisant des techniques de principes analytiques identiques sinon il est possible d'utiliser des codes examens différents pour le même paramètre ou d'utiliser un facteur de corrections (pour les techniques linéaires) **de manière transitoire**. Le laboratoire doit avoir une stratégie d'uniformisation des techniques pour un même paramètre.

<sup>7</sup> Pour les examens fournissant un résultat de type qualitatif, extrapolé à partir de la mesure d'une donnée quantifiable (absorbance par exemple), avec un effet de seuil (étude des faux positifs et des faux négatifs par exemple).



Toutefois, certains paramètres ne sont à vérifier que si cela s'avère utile et/ou possible selon les cas de figure propres à chacune des méthodes faisant l'objet de l'évaluation.

Ainsi, dans le cadre de l'évaluation des performances du système Minicap<sup>®</sup>, nous avons jugé non nécessaire la vérification des intervalles de mesure, incluant la limite de quantification et les limites de linéarité. En effet, dans le cas de l'électrophorèse de l'hémoglobine, les résultats ne sont pas rendus sous la forme de quantités mais de pourcentages. Les valeurs possibles pour chaque fraction d'hémoglobine, allant théoriquement de 0 à 100 %, pour une hémoglobine totale de l'ordre de 5 à 20 g/dL, ne se situent donc pas dans des zones très étendues. De plus, plusieurs études réalisées sur électrophorèse capillaire Sebia publiées dans la littérature ont montré une excellente linéarité dans la gamme de concentrations étudiées (90) (2) (39). Nous rapportons ces résultats dans le chapitre III.2.5 ci-dessous.

De même, l'étude des interférences s'est avérée inutile. Puisque que l'analyse est réalisée sur culot globulaire subissant ensuite l'action d'une solution hémolysante, aucune interférence plasmatique, telles la lipémie, l'hémoglobine plasmatique, la bilirubine ou encore la présence de médicaments, ne peut être attendue. De plus, les hémoglobines présentes dans l'échantillon sont détectées par spectrophotométrie d'absorbance à 415 nm, longueur d'onde d'absorption spécifique des hémoglobines, permettant d'exclure la présence d'interférences potentielles.

Enfin, plusieurs paramètres ont déjà été validés par le fournisseur et ne nécessitent pas de vérification sur site en portée de type A : la spécificité analytique, la stabilité des réactifs, la robustesse ainsi que la comparaison avec une méthode de référence.

Finalement, les paramètres qui feront l'objet d'une vérification sont la fidélité, la justesse, les incertitudes de mesure, la contamination inter-échantillons, l'intervalle de référence et la comparaison avec la méthode déjà utilisée au LBM.

Pour chacun de ces critères de performance à évaluer, il est nécessaire pour le biologiste de déterminer des limites d'acceptabilité avant de commencer la vérification expérimentale. Ces spécifications sont le plus souvent choisies en s'appuyant entre autres sur la documentation technique du fournisseur, les textes réglementaires, les attentes du prescripteur, les recommandations de sociétés savantes. Elles doivent être le reflet de l'état de l'art et de la pertinence clinique (85). Concernant les méthodes d'étude de l'hémoglobine, ni les sociétés savantes telles que Ricos ou la SFBC (Société Française de Biologie Clinique) ni la HAS (Haute Autorité de Santé) n'ont émis de spécifications, à une exception près. En effet, les seules spécifications existantes sont celles issues des travaux de Ricos *et al.*, et uniquement pour l'hémoglobine A2 (Tableau VI) (89).

**Tableau VI. Spécifications de fidélité intermédiaire (I), d'erreur de justesse (B) et d'erreur totale (TE) proposées par Ricos pour l'Hb A2, en fonction des variations biologiques intra-individuelle (CVw) et inter-individuelle (CVg).**

Analyte	Number of Papers	Biological Variation		Desirable specification		
		CVw	CVg	I (%)	B (%)	TE (%)
Hemoglobin A2	1	0,7	7,7	0,35	1,93	2,51

CVw = within-subject biologic variation

CVg = between-subject biologic variation

I = desirable specification for imprecision

B = desirable specification for inaccuracy

TE = desirable specification for allowable total error

Nous nous sommes donc appuyés sur les documents techniques du fournisseur et plus encore sur les besoins cliniques pour déterminer nos propres limites d'acceptabilité.

Nous allons développer ci-après, pour chacun des différents paramètres ayant fait l'objet d'une vérification sur site, les limites d'acceptabilité retenues et les résultats obtenus.

### III.2.2. Précision

L'étude de la précision inclut la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

La répétabilité est évaluée en analysant un même échantillon selon des conditions identiques : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. En pratique, il est recommandé de déterminer la répétabilité pour au moins 2 niveaux de concentration avec si possible un niveau proche du seuil décisionnel. Pour une exploitation statistique optimale des résultats, il est préconisé de réaliser 30 tests sur un même échantillon. Cependant, pour des raisons pratiques (coûts des analyses, durée d'analyse, volume d'échantillon...), ces 30 tests peuvent ne pas être réalisables. Le nombre inférieur de tests retenu doit alors être expliqué et reposé sur des arguments pertinents.

Ainsi, l'évaluation de la répétabilité sur des échantillons contenant des fractions variables de différents variants d'hémoglobine par Minicap® (Sebia) n'a pas toujours pu être réalisée sur 30 essais. En effet, l'analyse étant effectuée sur un volume minimal de 150 µl de culot globulaire (avec un volume optimal à 250 µL), il était difficile de répéter l'analyse 30 fois en raison d'un volume insuffisant de culot globulaire par tube. Cette insuffisance de volume était d'autant plus marquée lors de l'utilisation d'un échantillon pédiatrique pour

l'étude de la répétabilité sur une fraction élevée d'hémoglobine F. Nous avons donc répété les tests le plus grand nombre de fois que le permettait le volume de culot globulaire recueilli par tube.

La fidélité intermédiaire, anciennement appelée reproductibilité, est quant à elle évaluée en analysant un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages... En pratique, l'évaluation de la fidélité intermédiaire se fait le plus souvent en utilisant les résultats des contrôles internes de la qualité (CIQ) par le calcul de leurs coefficients de variation. Dans le cas de l'électrophorèse de l'hémoglobine par Minicap<sup>®</sup> Sebia, nous avons relevé les valeurs obtenus pour le contrôle interne de la qualité Hb AFSC, ainsi que les contrôles Hb A2 Normal et Hb A2 Pathologique.

La fidélité intermédiaire est établie sur au moins 15 jours avec 30 déterminations et à 2 niveaux minimum.

Pour la répétabilité comme pour la fidélité intermédiaire, le coefficient de variation calculé est comparé au coefficient de variation limite acceptable déterminé au préalable, basé sur les données du fournisseur et sur la pertinence clinique, en l'absence de recommandations émises par des sociétés savantes comme la SFBC, Ricos... ou autres référentiels.

### III.2.2.1. Répétabilité

Nous avons choisi de ne pas évaluer la répétabilité pour l'Hb A en raison du caractère peu pertinent de ce paramètre, d'un point de vue clinique, lors de l'interprétation d'une électrophorèse de l'hémoglobine. En effet, la mise en évidence d'une hémoglobinopathie ne repose pas principalement sur l'étude quantitative de cette fraction. Seule sa présence ou son absence dans l'échantillon constituent une information pertinente pour l'interprétation d'un profil électrophorétique. En outre, cette méthode consistant en une séparation et une quantification des différentes fractions de l'hémoglobine, exprimées en pourcentages, on peut supposer que si les autres fractions présentes dans un échantillon sont évaluées selon une répétabilité acceptable, il en sera de même pour la fraction complémentaire.

Dans le document technique du fournisseur, il est mentionné que la répétabilité a été étudiée en analysant 7 échantillons sanguins différents (sangs A et E normaux, sang B avec Hb S, sangs C et H avec Hb F, sang F avec Hb A2 augmentée et sang G avec Hb A, Hb F, Hb S et Hb C) en parallèle sur trois systèmes Minicap<sup>®</sup>. Chaque échantillon a été analysé 5 fois simultanément sur les 2 capillaires de chaque système Minicap<sup>®</sup>, permettant le calcul des moyennes, écarts-types (ET) et coefficients de variation (CV) (n=10) pour chaque fraction de l'hémoglobine des 7 échantillons sanguins. Les CV ainsi obtenus, tous échantillons confondus, varient de 0,0 à 9,3 % pour l'Hb A2, de 0,7 à 2,4 % pour l'Hb F, de 0,8 à 2,1 %

pour l'Hb S et de 2,0 à 3,0 % pour l'Hb C, avec, comme on pouvait s'y attendre, les valeurs de CV les plus importantes pour les fractions les plus faibles.

Dans la littérature, plusieurs études réalisées sur un instrument d'électrophorèse capillaire Sebia ont été publiées.

En l'occurrence, en 2011, une équipe thaïlandaise, Winichagoon *et al.*, a évalué le système Capillarys<sup>®</sup> pour le diagnostic rapide des thalassémies et autres hémoglobinopathies (90). Le système Capillarys<sup>®</sup> présente le même principe de fonctionnement et la même technologie de migration que le système Minicap<sup>®</sup>. La différence entre ces deux automates réside uniquement sur une cadence supérieure pour Capillarys<sup>®</sup>, possédant huit capillaires de migration alors que Minicap<sup>®</sup> en comptent deux. Parmi les paramètres étudiés, la répétabilité a été déterminée en analysant plusieurs échantillons contenant de l'Hb A2 et de l'Hb F à différentes concentrations. Ces échantillons provenaient d'un patient normal, un patient porteur d'un trait  $\beta$ -thalassémique, un patient hétérozygote  $\beta$ -thalassémie/Hb E et un patient hétérozygote  $\beta$ -thalassémie/Hb E ayant reçu une transfusion sanguine récente. Chacun de ces échantillons a été analysé 20 fois consécutivement. Les résultats ont montré des CV à 2,06 % pour l'Hb A2 et 9,33 % pour l'Hb F chez un sujet normal, présentant des concentrations d'Hb A2 et Hb F incluses dans l'intervalle de référence. Pour les concentrations élevées d'Hb A2, Hb E et Hb F présentes dans l'échantillon  $\beta$ -thalassémie/Hb E, les CV étaient de 3,23 % pour l'Hb A2, 0,73 % pour l'Hb E et 5,93 % pour l'Hb F.

En 2012, Agouti *et al.* a publié une étude portant sur le système Capillarys 2 Flex Piercing<sup>®</sup> (Sebia, France) (2). Cette automate d'électrophorèse capillaire fonctionne sur le même principe que le système Capillarys<sup>®</sup>, avec huit capillaires de migration au lieu de deux pour Minicap<sup>®</sup>, mais il possède en plus un dispositif de perçage de bouchons et d'agitation des tubes permettant de réaliser l'analyse sur sang total, contrairement à Minicap<sup>®</sup> et Capillarys<sup>®</sup> qui nécessitent la préparation d'un culot globulaire. Agouti *et al.* a évalué la répétabilité en utilisant huit échantillons sanguins contenant des proportions variables d'Hb A2 (de 2,2 à 4,9 %) et d'Hb F (de 0,4 à 2,7 %). Chacun de ces huit échantillons a fait l'objet de dix analyses consécutives au sein d'une même série. Les résultats ont montré des CV toujours inférieurs à 2,13 % pour l'Hb A2, quel que soit le niveau. En revanche, ils ont mis en évidence une faible précision pour des valeurs très basses d'Hb F (<1 %), avec notamment un CV de 10,91 % pour une Hb F moyenne de 0,59 %. La fidélité intermédiaire s'est toutefois révélée meilleure pour des valeurs plus élevées d'Hb F. En effet, le CV calculé était de 2,01 % pour une valeur moyenne d'Hb F à 6,38 %.

En regard de ces résultats et dans le souci de respecter une pertinence d'interprétation clinique, nous avons retenu une limite d'acceptabilité de 5 % pour le CV de chaque fraction de l'hémoglobine, quel qu'en soit le niveau.

Nous avons évalué la répétabilité pour les fractions de l'hémoglobine les plus importantes en clinique : Hb A2, Hb F, Hb S, Hb C et Hb E. L'Hb A2, présente à des taux faibles, de l'ordre de 2,5 à 3,5 %, chez le sujet normal, doit être quantifiée suffisamment précisément pour la mise en évidence des thalassémies, le taux d'Hb

A2 pouvant notamment être abaissé dans les  $\alpha$ -thalassémies et augmenté dans les  $\beta$ -thalassémies.

Le taux d'Hb F est lui aussi très informatif concernant la présence d'éventuelles hémoglobinopathies. Présente à une concentration très faible, habituellement inférieure à 1 %, chez le sujet sain à partir de l'âge de 2 ans où l'érythropoïèse adulte est en place, l'Hb F peut être augmentée dans certaines anomalies de l'Hb comme les  $\beta$ -thalassémies, les  $\delta\beta$ -thalassémies, les situations de Persistance Hériditaire de l'Hémoglobine Fœtale (PHHF), dans les anomalies qualitatives de l'hémoglobine telles la drépanocytose, l'hémoglobinose E ou encore l'hémoglobinose C. Cependant, outre les anomalies de l'hémoglobine, l'Hb F est physiologiquement élevée dans les échantillons de sang fœtal et chez le jeune enfant et peut également être augmentée dans certains cancers et dans des situations de stress hématopoïétiques avec régénération (30).

De même, il nous est apparu nécessaire d'évaluer la précision de la quantification des Hb S, Hb C et Hb E, celles-ci représentant les variants de l'hémoglobine les plus souvent impliqués en pathologie humaine.

Concernant l'Hb A2, la répétabilité a été évaluée à deux niveaux de concentration. Un échantillon sanguin provenant d'un sujet sain a été utilisé pour déterminer la répétabilité de l'Hb A2 à une concentration physiologique (Hb A2 moyenne = 3,33%). Un second échantillon, provenant d'un patient présentant une  $\beta$ -thalassémie mineure, a permis de réaliser l'étude pour une valeur d'Hb A2 proche du seuil décisionnel (Hb A2 moyenne = 5,42 %). L'analyse a pu être répétée 30 fois pour l'échantillon provenant d'un donneur sain, plusieurs tubes de sang ayant été prélevés chez cette personne. En revanche, pour l'échantillon avec  $\beta$ -thalassémie mineure, le volume du culot globulaire obtenu n'a pas permis de répéter 30 fois l'analyse, seuls 15 passages ont pu être réalisés. A partir des différentes valeurs obtenues à chaque passage, le CV calculé était de 4,74 % pour le niveau 1 et de 2,23 % pour le niveau 2.

Concernant l'Hb F, il n'était pas possible de calculer de CV pour les valeurs normales retrouvées chez les sujets sains, celles-ci étant rendues inférieures à 1 %. Cependant, l'intérêt du dosage de l'Hb F réside surtout dans la signification pathologique d'une valeur anormalement élevée. Nous avons évalué la répétabilité à deux niveaux de concentration, le premier niveau à partir d'un échantillon de patient ayant une  $\beta$ -thalassémie mineure (Hb F moyenne à 4,97 %) et le second niveau à partir d'un patient drépanocytaire (Hb F moyenne à 9,98 %). Le niveau 1 a pu être analysé 20 fois, tandis que seuls 16 passages ont été possibles pour le niveau 2. Ainsi, nous avons calculé un CV égal à 1,47 % pour le niveau 1 et 3,48 % pour le niveau 2. Nous n'avons pas étudié la répétabilité à des valeurs plus élevées d'Hb F, d'une part pour des raisons pratiques, aucun échantillon patient adéquat ne s'étant présenté. D'autre part, on peut s'attendre à une meilleure précision pour des valeurs plus élevées, ce qui rend moins utile cette détermination.

Afin d'étudier la répétabilité pour l'Hb S, nous avons utilisé trois échantillons de patients drépanocytaires présentant des concentrations différentes en Hb S. Le taux moyen d'Hb S est de 20,51 % pour le niveau 1 ; 44,64 % pour le niveau 2 et 79,53 % pour le niveau 3. Ainsi le niveau 2 permet de se rapprocher des taux moyens d'Hb S observés au diagnostic

chez les patients drépanocytaires hétérozygotes et le niveau 3 correspond à un échantillon de patient drépanocytaire homozygote. Le nombre de passages pour chacun des niveaux 1, 2 et 3 était respectivement de 15, 9 et 16. Pour des concentrations en Hb S de plus en plus importantes, on pourrait s'attendre à des valeurs de CV de plus en plus faibles. Or, celui-ci est de 0,85 % pour le niveau 1 ; 2,72 % pour le niveau 2 et de 0,77 % pour le niveau 3. Une explication de cette valeur de CV plus élevée pour le niveau 2 pourrait être le nombre de passages plus faible par rapport aux deux autres niveaux. Quoi qu'il en soit, on constate une excellente répétabilité pour l'Hb S.

Enfin, l'Hb C et l'Hb E étant plus rarement identifiées au laboratoire et, par conséquent, le nombre d'échantillons disponibles très faible, la répétabilité pour ces deux variants a été étudiée sur un seul niveau de concentration. En revanche, que ce soit pour l'Hb C comme pour l'Hb E, le niveau de concentration étudié nous a semblé pertinent puisque proche de celui obtenu dans les hémoglobinoses C ou E hétérozygotes. En effet, un échantillon contenant en moyenne 36,19 % d'Hb C a été analysé 10 fois. Le CV calculé est de 2,39 %. De même, un échantillon contenant en moyenne 27,76 % d'Hb E a été analysé 12 fois. Le CV obtenu est de 2,46 %.

## Etude de la REPETABILITE

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

Hémoglobine A2

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

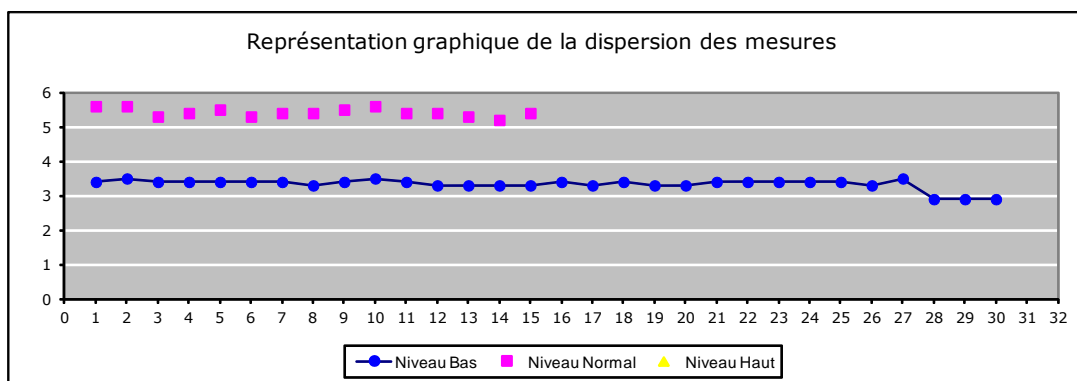
<u>date</u>	Niveau 1 : 19/06/2012 Niveau 2 : 07/06/2012
<u>Réactifs</u>	
<u>Unité</u>	%
<u>Echantillon</u>	Niveau 1 = échantillon normal ; Niveau 2 = bêta-thalassémie mineure
<u>Commentaires</u>	

### Résultats des mesures

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
1	3,4	5,6	
2	3,5	5,6	
3	3,4	5,3	
4	3,4	5,4	
5	3,4	5,5	
6	3,4	5,3	
7	3,4	5,4	
8	3,3	5,4	
9	3,4	5,5	
10	3,5	5,6	
11	3,4	5,4	
12	3,3	5,4	
13	3,3	5,3	
14	3,3	5,2	
15	3,3	5,4	
16	3,4		
17	3,3		
18	3,4		
19	3,3		
20	3,3		
21	3,4		
22	3,4		
23	3,4		
24	3,4		
25	3,4		
26	3,3		
27	3,5		
28	2,9		
29	2,9		
30	2,9		

### Résultats statistiques

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
<b>Nombre de valeurs</b>	<b>30</b>	<b>15</b>	
<b>Moyenne</b>	<b>3,33</b>	<b>5,42</b>	
<b>Ecart-type</b>	<b>0,16</b>	<b>0,12</b>	
<b>CV (%)</b>	<b>4,74</b>	<b>2,23</b>	
valeur min	2,9	5,2	
valeur max	3,5	5,6	
moyenne - 2SD	3,01	5,18	
moyenne + 2SD	3,65	5,66	



## Etude de la REPETABILITE

**Structure**  
**UF**

SHB

**Paramètre**  
**Instrument**

Hémoglobine F  
Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

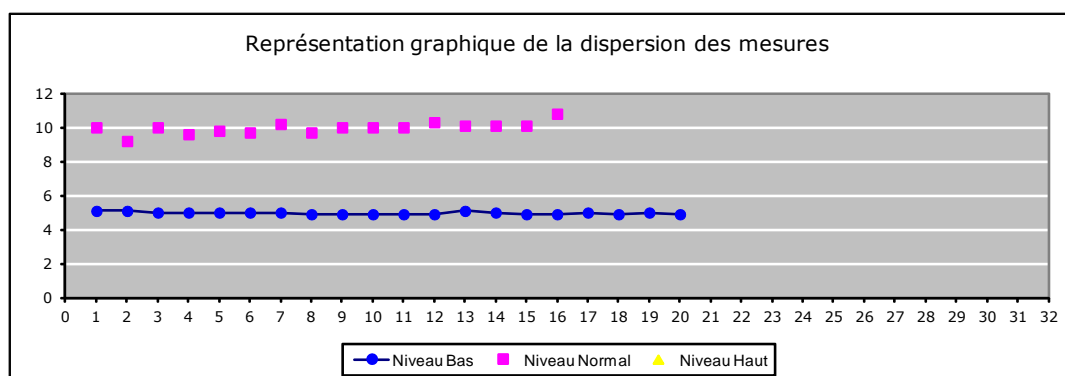
<u>date</u>	Niveau 1 : 11/12/2012 Niveau 2 : 27/09/2012
<u>Réactifs</u>	
<u>Unité</u>	%
<u>Echantillon</u>	Niveau 1 = bêta-thalassémie mineure ; Niveau 2 = drépanocytose
<u>Commentaires</u>	

### Résultats des mesures

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
1	5,1	10	
2	5,1	9,2	
3	5	10	
4	5	9,6	
5	5	9,8	
6	5	9,7	
7	5	10,2	
8	4,9	9,7	
9	4,9	10	
10	4,9	10	
11	4,9	10	
12	4,9	10,3	
13	5,1	10,1	
14	5	10,1	
15	4,9	10,1	
16	4,9	10,8	
17	5		
18	4,9		
19	5		
20	4,9		
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

### Résultats statistiques

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
<b>Nombre de valeurs</b>	<b>20</b>	<b>16</b>	
<b>Moyenne</b>	<b>4,97</b>	<b>9,98</b>	
<b>Ecart-type</b>	<b>0,07</b>	<b>0,35</b>	
<b>CV (%)</b>	<b>1,47</b>	<b>3,48</b>	
valeur min	4,9	9,2	
valeur max	5,1	10,8	
moyenne - 2SD	4,82	9,28	
moyenne + 2SD	5,12	10,67	





## Etude de la REPETABILITE

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

Hémoglobine S

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

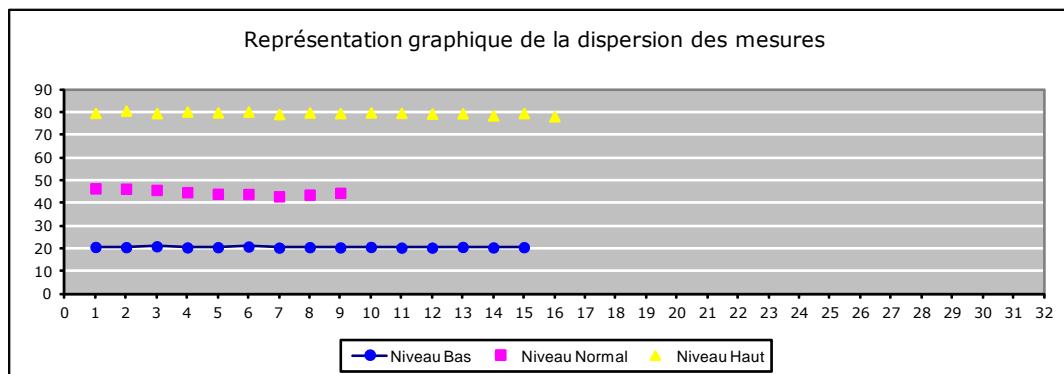
<u>date</u>	Niveau 1 : 09/11/2012 Niveau 2 : 16/11/2012 Niveau 3 : 27/09/2012
<u>Réactifs</u>	
<u>Unité</u>	%
<u>Echantillon</u>	Niveaux 1, 2 et 3 : drépanocytoses
<u>Commentaires</u>	

### Résultats des mesures

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
1	20,6	46,4	79,6
2	20,5	46,2	80,6
3	20,9	45,7	79,5
4	20,4	44,7	80,2
5	20,5	44	79,8
6	20,8	43,9	80,2
7	20,3	42,9	79,1
8	20,5	43,6	79,8
9	20,4	44,4	79,5
10	20,6		79,8
11	20,3		79,6
12	20,3		79,3
13	20,6		79,4
14	20,4		78,5
15	20,5		79,5
16			78,1
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

### Résultats statistiques

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
<b>Nombre de valeurs</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>16</b>
<b>Moyenne</b>	<b>20,51</b>	<b>44,64</b>	<b>79,53</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,18</b>	<b>1,21</b>	<b>0,61</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0,85</b>	<b>2,72</b>	<b>0,77</b>
valeur min	20,3	42,9	78,1
valeur max	20,9	46,4	80,6
moyenne - 2SD	20,16	42,22	78,31
moyenne + 2SD	20,86	47,07	80,76



## Etude de la REPETABILITE

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

Hémoglobine C

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

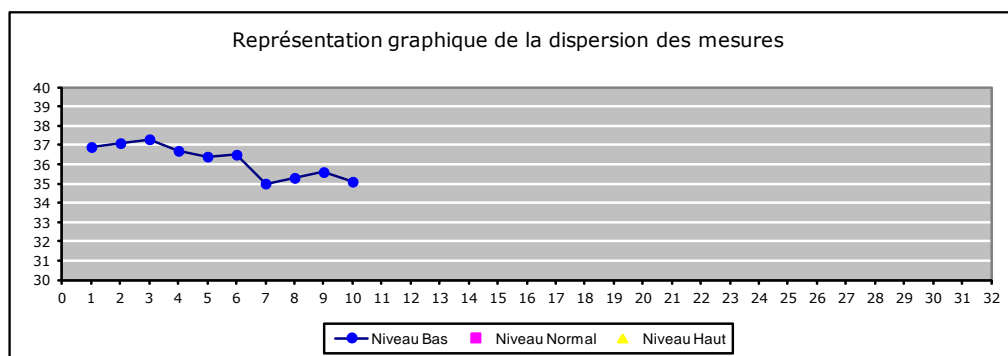
<u>date</u>	13/07/2012
<u>Réactifs</u>	
<u>Unité</u>	%
<u>Echantillon</u>	Hémoglobinosé C
<u>Commentaires</u>	

### Résultats des mesures

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
1	36,9		
2	37,1		
3	37,3		
4	36,7		
5	36,4		
6	36,5		
7	35		
8	35,3		
9	35,6		
10	35,1		
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

### Résultats statistiques

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
<b>Nombre de valeurs</b>	<b>10</b>		
<b>Moyenne</b>	<b>36,19</b>		
<b>Ecart-type</b>	<b>0,86</b>		
<b>CV (%)</b>	<b>2,39</b>		
valeur min	35		
valeur max	37,3		
moyenne - 2SD	34,46		
moyenne + 2SD	37,92		



## Etude de la REPETABILITE

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

Hémoglobine E

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

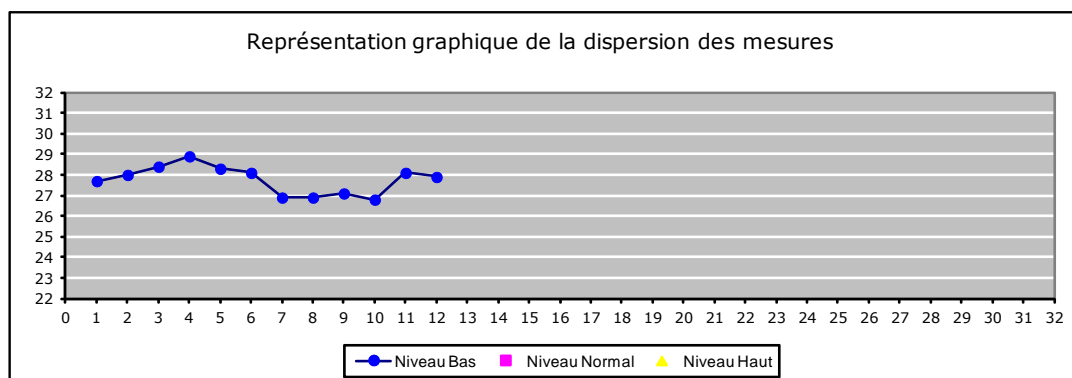
<u>date</u>	06/09/2012
<u>Réactifs</u>	
<u>Unité</u>	%
<u>Echantillon</u>	Hémoglobinoase E
<u>Commentaires</u>	

### Résultats des mesures

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
1	27,7		
2	28		
3	28,4		
4	28,9		
5	28,3		
6	28,1		
7	26,9		
8	26,9		
9	27,1		
10	26,8		
11	28,1		
12	27,9		
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

### Résultats statistiques

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
<b>Nombre de valeurs</b>	<b>12</b>		
<b>Moyenne</b>	<b>27,76</b>		
<b>Ecart-type</b>	<b>0,68</b>		
<b>CV (%)</b>	<b>2,46</b>		
valeur min	26,8		
valeur max	28,9		
moyenne - 2SD	26,39		
moyenne + 2SD	29,13		



Le tableau suivant (Tableau VII) récapitule les résultats de cette étude de répétabilité.

**Tableau VII. Résumé des données obtenues lors de l'étude de répétabilité.**

Hémoglobine	Niveau 1		Niveau 2		Niveau 3	
	Moyenne (%)	CV (%)	Moyenne (%)	CV (%)	Moyenne (%)	CV (%)
Hb A2	3,33	4,74	5,42	2,23		
Hb F	4,97	1,47	9,98	3,48		
Hb S	20,51	0,85	44,64	2,72	79,53	0,77
Hb C	36,19	2,39				
Hb E	27,76	2,46				

Nous constatons que le CV calculé pour la répétabilité est toujours inférieur à 5 %, quelles que soient les fractions d'hémoglobine et leur concentration. Ceci répond donc bien aux spécifications émises au préalable.

### III.2.2.2. Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire reposant sur l'analyse répétée d'un même échantillon en faisant varier au moins un facteur, on peut s'attendre à une moindre précision, autrement dit un CV plus important, que pour la répétabilité. Nous avons donc retenu une limite maximale acceptable de 10 % pour chacune des hémoglobines. Cette spécification nous semble en effet acceptable et adaptée pour une interprétation pertinente des profils électrophorétiques.

En 2008, Keren *et al.* a évalué la fidélité intermédiaire sur le système Capillarys® à partir de 17 passages d'un contrôle interne de la qualité contenant des Hb A, Hb F, Hb S et Hb C (54). Les moyennes, ET et CV calculés sont présentés dans le tableau suivant (Tableau VIII).

**Tableau VIII. Résultats de l'étude de fidélité intermédiaire sur Capillarys® réalisée par Keren *et al.***

Hémoglobine	Moyenne (%)	ET (%)	CV (%)
Hb A	28,1	0,54	1,91
Hb F	31,0	0,43	1,39
Hb S	30,8	0,49	1,60
Hb C	10,2	0,28	2,76

En 2009, Higgins *et al.* a étudié la fidélité intermédiaire sur le système Capillarys 2® en utilisant les échantillons de contrôle Bio-Rad Lyphocheck Hb A2 (niveaux 1 et 2) et Helena ASFC sur une période de quatre mois (50).

Le contrôle Helena ASFC fournit des valeurs de CV satisfaisantes : 1,84 % pour l'Hb S (concentration moyenne de 19,61 %), 4,36 % pour l'Hb C (concentration moyenne de 6,60 %) et 4,03 % pour l'Hb F (concentration moyenne de 21,36 %).

Les résultats obtenus à partir des deux niveaux du contrôle Bio-Rad Lyphocheck A2 ont montré un CV de 6,4 % pour une Hb A2 moyenne de 2,08 % et un CV de 6,0 % pour une Hb A2 moyenne de 4,69 %. Le CV calculé pour l'Hb S, présente uniquement dans le niveau 2 et à une concentration moyenne de 31,16 %, était de 1,06 %. En revanche, les valeurs des CV pour l'Hb F sont très élevées : 93,33 % pour le niveau 1, correspondant à une Hb F moyenne de 0,33 %, et 12,42 % pour le niveau 2, correspondant à une Hb F moyenne de 8,16 %.

Toutefois, les auteurs précisent que ces mauvais résultats doivent être nuancés puisqu'ils ne représentent probablement pas la véritable précision pour les échantillons de patients. En effet, les contrôles utilisés se présentent sous forme de sang total alors que la matrice recommandée pour le Capillarys 2®, en l'absence du système Flex Piercing, est un culot globulaire. En outre, la raison invoquée pour expliquer les mauvais résultats observés pour l'Hb F à basses concentrations est un bruit de fond trop important par rapport au signal à ces concentrations. Cependant, Higgins *et al.* argumente et précise que la faible performance analytique constatée pour des concentrations faibles d'Hb F n'a pas ou peu d'impact clinique significatif, alors qu'en revanche, pour les concentrations d'Hb F associées à une Persistance Hériditaire de l'Hémoglobine Foétale (PHHF) ou à d'autres situations cliniques pathologiques, la précision est acceptable.

Yang *et al.* a également publié en 2009 une étude dans laquelle il a, entre autres, évalué la fidélité intermédiaire pour des valeurs normales et des valeurs élevées d'Hb A2 (92). Pour des valeurs normales d'Hb A2 (valeur cible à 2,7 %), les CV étaient compris entre 1,4 % et 3,0 %. Pour des valeurs élevées d'Hb A2 (valeur cible à 5,5 %), les CV étaient compris entre 0,7 % et 2,9 %.

Dans une autre étude publiée en 2012 par Agouti *et al.*, la fidélité intermédiaire est étudiée sur le système Capillarys 2 Flex Piercing® à l'aide de cinq contrôles de qualité comportant de l'Hb A2 à des valeurs normales ou élevées et quatre contrôles de qualité comportant de l'Hb F à des valeurs normales ou élevées (2). Cinq analyses ont été réalisées, sachant que chaque échantillon migrait sur les huit capillaires durant chaque analyse. Les résultats ont montré un CV égal à 1,43 % pour une Hb A2 à une concentration de 2,21 % en moyenne et un CV de 1,05 % pour une Hb A2 moyenne de 4,94 %. Concernant l'Hb F, le CV était de 11,23 % pour une Hb F moyenne de 0,43 % tandis qu'il était de 3,08 % pour une Hb F moyenne de 2,67 %. Cette étude a donc démontré une bonne fidélité intermédiaire pour l'Hb A2 et l'Hb F sur Capillarys 2 Flex Piercing®, hormis pour les valeurs très basses de l'Hb F (<1 %).

Greene *et al.* a aussi évalué la fidélité intermédiaire sur Capillarys Flex<sup>®</sup> (39). Il a utilisé 3 échantillons de contrôle contenant tous de l'Hb A et de l'Hb A2. Deux de ces échantillons de contrôle contenaient aussi de l'Hb F et un des contrôles contenait de l'Hb S. Cette évaluation reposait sur 12 séries consécutives, avec 2 lots différents de tampon utilisés. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant (Tableau IX).

**Tableau IX. Résultats de l'étude de fidélité intermédiaire sur Capillarys Flex<sup>®</sup> réalisée par Greene *et al.* (39).**

	Hb A QC 1	Hb A QC 2	Hb A QC 3	Hb A2 QC 1	Hb A2 QC 2	Hb A2 QC 3	Hb F QC 1	Hb F QC 2	Hb S QC 1
Mean (%)	97.4	96.8	55.3	2.6	2.3	4.9	0.97	9.9	29.9
SD	0.07	0.12	0.5	0.07	0.08	0.17	0.07	0.18	0.37
CV (%)	0.1	0.1	0.9	2.6	3.4	3.5	7.1	1.8	1.2

Les CV calculés étaient tous inférieurs à 5 %, sauf pour les valeurs faibles d'Hb F (CV à 7,1 %). Conformément aux études précédentes, les auteurs concluaient donc en une très bonne précision, exceptée pour les valeurs basses d'Hb F.

Pour évaluer la fidélité intermédiaire sur Minicap<sup>®</sup>, nous avons utilisé les valeurs des CIQ passés lors de chaque série d'analyses et calculer le CV correspondant pour chacune des fractions d'Hb A2, Hb A, Hb F, Hb S et Hb C. Ces valeurs ont été obtenues à partir de 30 séries d'analyses différentes, réalisées par différents opérateurs sur une période de 4 mois. Au cours de cette période d'étude, deux kits de réactifs présentant des numéros de lots différents ont été utilisés.

## Etude de la Fidélité intermédiaire (REPRODUCTIBILITE)

<b>Structure</b>	SHB
<b>UF</b>	
<b>Paramètre</b>	Hémoglobine A2
<b>Instrument</b>	Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

<b>date</b>	Du 07/08/2012 au 11/12/2012
<b>Réactifs</b>	
<b>Unité</b>	%
<b>Echantillon</b>	CIQ A2 Normal, CIQ AFSC et CIQ A2 Pathologique
<b>Commentaires</b>	Niveau 1 = A2 Normal ; Niveau 2 = AFSC ; Niveau 3 = A2 Pathologique

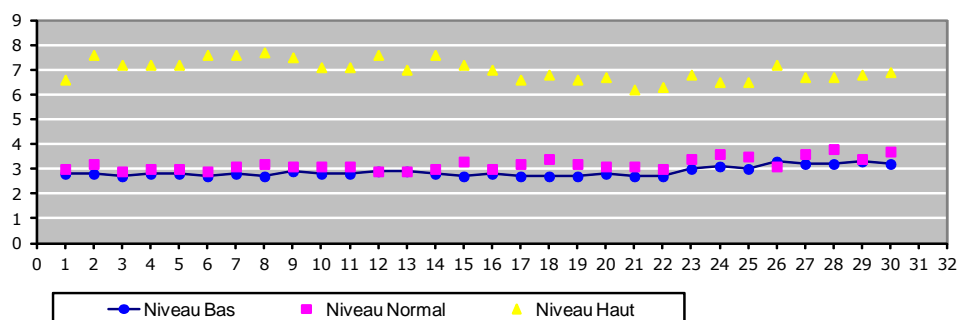
### Résultats des mesures

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
1	2,8	3,00	6,6
2	2,8	3,20	7,6
3	2,7	2,9	7,2
4	2,8	3	7,2
5	2,8	3	7,2
6	2,7	2,9	7,6
7	2,8	3,1	7,6
8	2,7	3,2	7,7
9	2,9	3,1	7,5
10	2,8	3,1	7,1
11	2,8	3,1	7,1
12	2,9	2,9	7,6
13	2,9	2,9	7
14	2,8	3	7,6
15	2,7	3,3	7,2
16	2,8	3	7
17	2,7	3,2	6,6
18	2,7	3,4	6,8
19	2,7	3,2	6,6
20	2,8	3,1	6,7
21	2,7	3,1	6,2
22	2,7	3	6,3
23	3	3,4	6,8
24	3,1	3,6	6,5
25	3	3,5	6,5
26	3,3	3,1	7,2
27	3,2	3,6	6,7
28	3,2	3,8	6,7
29	3,3	3,4	6,8
30	3,2	3,7	6,9

### Résultats statistiques

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
<b>Nombre de valeurs</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>
<b>Moyenne</b>	<b>2,88</b>	<b>3,19</b>	<b>7,00</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,19</b>	<b>0,25</b>	<b>0,43</b>
<b>CV (%)</b>	<b>6,75</b>	<b>7,84</b>	<b>6,09</b>
valeur min	2,7	2,9	6,2
valeur max	3,3	3,8	7,7
moyenne - 2SD	2,49	2,69	6,15
moyenne + 2SD	3,27	3,69	7,86

Représentation graphique de la dispersion des mesures



## Etude de la Fidélité intermédiaire (REPRODUCTIBILITE)

<b>Structure</b>	SHB
<b>UF</b>	
<b>Paramètre</b>	Hémoglobine A
<b>Instrument</b>	Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

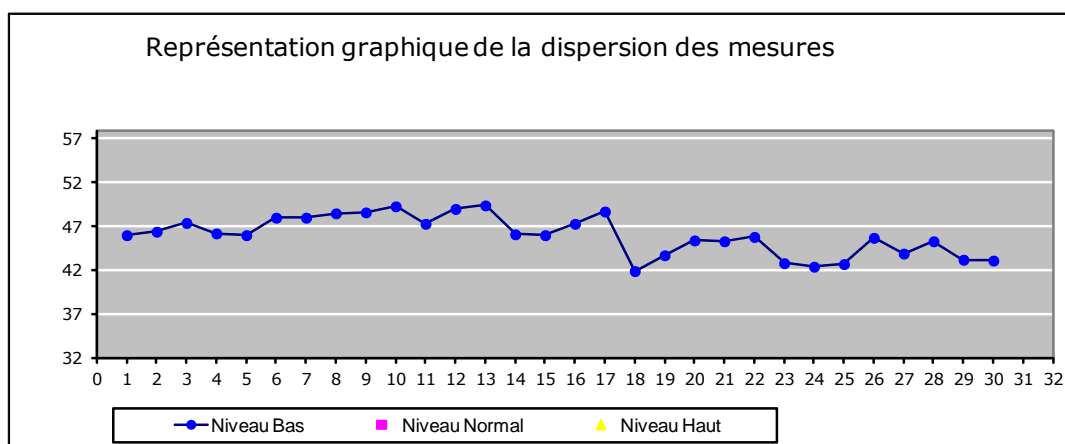
<b>date</b>	Du 07/08/2012 au 11/12/2012
<b>Réactifs</b>	
<b>Unité</b>	%
<b>Echantillon</b>	CIQ AFSC
<b>Commentaires</b>	

### Résultats des mesures

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
1	46		
2	46,4		
3	47,4		
4	46,2		
5	46		
6	48		
7	48		
8	48,5		
9	48,6		
10	49,3		
11	47,3		
12	49		
13	49,4		
14	46,1		
15	46		
16	47,3		
17	48,7		
18	41,9		
19	43,7		
20	45,4		
21	45,3		
22	45,8		
23	42,8		
24	42,4		
25	42,7		
26	45,7		
27	43,9		
28	45,3		
29	43,2		
30	43,1		

### Résultats statistiques

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
<b>Nombre de valeurs</b>	<b>30</b>		
<b>Moyenne</b>	<b>45,98</b>		
<b>Ecart-type</b>	<b>2,23</b>		
<b>CV (%)</b>	<b>4,84</b>		
valeur min	41,9		
valeur max	49,4		
moyenne - 2SD	41,53		
moyenne + 2SD	50,43		





## Etude de la Fidélité intermédiaire (REPRODUCTIBILITE)

<b>Structure</b>	SHB
<b>UF</b>	
<b>Paramètre</b>	Hémoglobine F
<b>Instrument</b>	Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

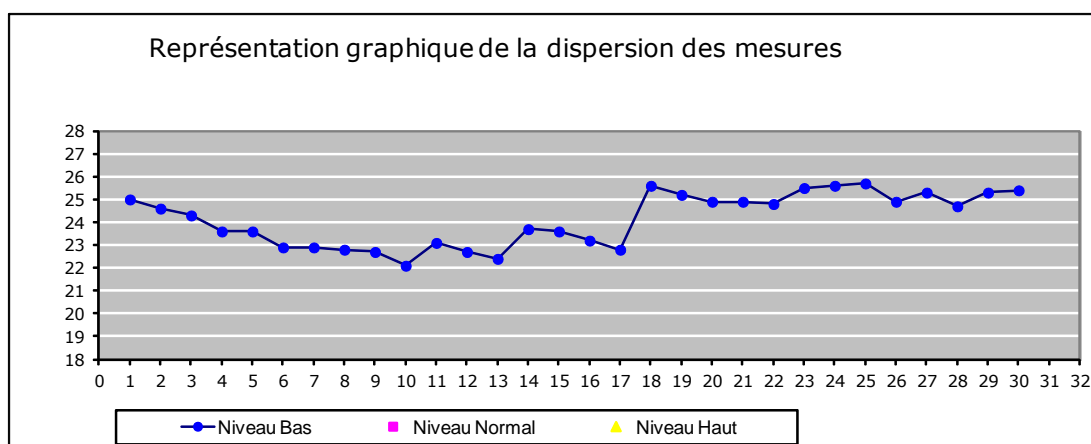
<b>date</b>	Du 07/08/2012 au 11/12/2012
<b>Réactifs</b>	
<b>Unité</b>	%
<b>Echantillon</b>	CIQ AFSC
<b>Commentaires</b>	

### Résultats des mesures

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
1	25		
2	24,6		
3	24,3		
4	23,6		
5	23,6		
6	22,9		
7	22,9		
8	22,8		
9	22,7		
10	22,1		
11	23,1		
12	22,7		
13	22,4		
14	23,7		
15	23,6		
16	23,2		
17	22,8		
18	25,6		
19	25,2		
20	24,9		
21	24,9		
22	24,8		
23	25,5		
24	25,6		
25	25,7		
26	24,9		
27	25,3		
28	24,7		
29	25,3		
30	25,4		

### Résultats statistiques

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
<b>Nombre de valeurs</b>	<b>30</b>		
<b>Moyenne</b>	<b>24,13</b>		
<b>Ecart-type</b>	<b>1,15</b>		
<b>CV (%)</b>	<b>4,77</b>		
valeur min	22,1		
valeur max	25,7		
moyenne - 2SD	21,82		
moyenne + 2SD	26,43		



## Etude de la Fidélité intermédiaire (REPRODUCTIBILITE)

<b>Structure</b>	SHB
<b>UF</b>	
<b>Paramètre</b>	Hémoglobine S
<b>Instrument</b>	Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

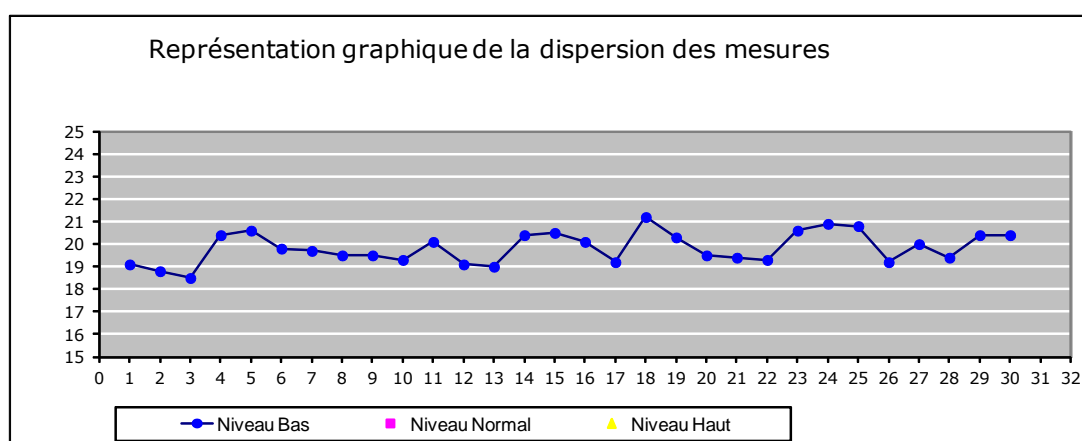
<b>date</b>	Du 07/08/2012 au 11/12/2012
<b>Réactifs</b>	
<b>Unité</b>	%
<b>Echantillon</b>	CIQ AFSC
<b>Commentaires</b>	

### Résultats des mesures

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
1	19,1		
2	18,8		
3	18,5		
4	20,4		
5	20,6		
6	19,8		
7	19,7		
8	19,5		
9	19,5		
10	19,3		
11	20,1		
12	19,1		
13	19		
14	20,4		
15	20,5		
16	20,1		
17	19,2		
18	21,2		
19	20,3		
20	19,5		
21	19,4		
22	19,3		
23	20,6		
24	20,9		
25	20,8		
26	19,2		
27	20		
28	19,4		
29	20,4		
30	20,4		

### Résultats statistiques

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
<b>Nombre de valeurs</b>	<b>30</b>		
<b>Moyenne</b>	<b>19,83</b>		
<b>Ecart-type</b>	<b>0,69</b>		
<b>CV (%)</b>	<b>3,50</b>		
valeur min	18,5		
valeur max	21,2		
moyenne - 2SD	18,45		
moyenne + 2SD	21,22		



## Etude de la Fidélité intermédiaire (REPRODUCTIBILITE)

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

Hémoglobine C

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

date Du 07/08/2012 au 11/12/2012

Réactifs

Unité

%

Echantillon

CIQ AFSC

Commentaires

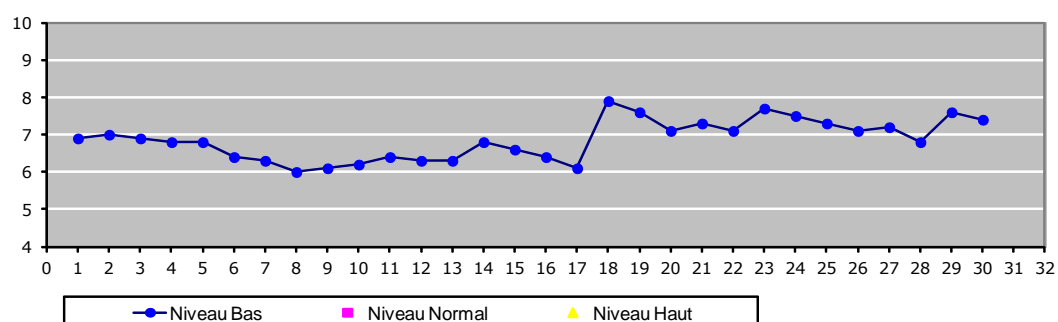
### Résultats des mesures

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
1	6,9		
2	7		
3	6,9		
4	6,8		
5	6,8		
6	6,4		
7	6,3		
8	6		
9	6,1		
10	6,2		
11	6,4		
12	6,3		
13	6,3		
14	6,8		
15	6,6		
16	6,4		
17	6,1		
18	7,9		
19	7,6		
20	7,1		
21	7,3		
22	7,1		
23	7,7		
24	7,5		
25	7,3		
26	7,1		
27	7,2		
28	6,8		
29	7,6		
30	7,4		

### Résultats statistiques

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
<b>Nombre de valeurs</b>	<b>30</b>		
<b>Moyenne</b>	<b>6,86</b>		
<b>Ecart-type</b>	<b>0,53</b>		
<b>CV (%)</b>	<b>7,78</b>		
valeur min	6,0		
valeur max	7,9		
moyenne - 2SD	5,80		
moyenne + 2SD	7,93		

Représentation graphique de la dispersion des mesures



Pour toutes les hémoglobines, et quel que soit leur niveau de concentration, les CV calculés sont inférieurs à 10 %, répondant ainsi aux spécifications choisies. On peut même remarquer que ces résultats sont tous inférieurs à 8 %, donc bien en-deçà de la limite maximale que l'on s'était fixée. Ainsi, l'étude de fidélité intermédiaire, tout comme l'étude de répétabilité, confirme la bonne précision de cette méthode.

### III.2.3. Approche de la justesse

En portée flexible standard A, une vérification de la justesse, ou plus précisément de l'approche de la justesse, doit être menée, dès que possible. Concernant les méthodes d'électrophorèse de l'hémoglobine, il n'existe pas de contrôles internes de la qualité externalisés. Il n'est donc pas possible à l'heure actuelle d'évaluer le biais de la méthode. En revanche, l'inexactitude de la méthode peut être évaluée en comparant les valeurs obtenues sur des échantillons d'évaluations externes de la qualité (EEQ) aux valeurs cibles (25) (8). La valeur cible retenue correspond à la moyenne des résultats obtenus avec la même méthode (groupe de pairs). L'inexactitude ainsi obtenue permet une approche de l'écart par rapport à la valeur cible.

Depuis juin 2013, le laboratoire d'Hématologie du CHU de Nancy participe au programme de comparaison inter-laboratoires UK NEQAS, un des rares programmes d'EEQ présents sur le marché pour les anomalies de l'hémoglobine. Trois échantillons sont envoyés selon un rythme bimestriel aux participants. L'évaluation de l'inexactitude a ainsi pu être réalisée pour les Hb A2, Hb F et Hb S. Afin d'assurer une quantification pertinente des hémoglobines en rapport avec la situation clinique, nous avons établi nos spécifications à  $\pm 0,5$  % pour l'Hb A2 et pour l'Hb F et à  $\pm 1,0$  % pour l'Hb S.

## Inexactitude et incertitude de mesure

**Structure**  
**UF**

SHB

**Paramètre**  
**Instrument**

Hémoglobine A2  
Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

<u>date</u>	Juin 2013 à juin 2014
<u>Réactifs</u>	UK NEQAS
<u>Unité</u>	%
<u>Commentaires</u>	

### Niveau 1

#### EEQ

Date	Valeur obtenue	Valeur Pairs	Valeur t tech	Différence	Inexactitude (%)	Inexactitude (% t tech)
juin-13	1,7	1,6	1,6	0,1	6,2	6,2
juin-13	2,2	2,2	2,1	0	0,0	4,8
août-13	2,9	2,9	2,9	0	0,0	0,0
oct-13	2,3	2,2	2,2	0,1	4,5	4,5
déc-13	2,7	2,7	2,7	0	0,0	0,0
déc-13	2,3	2,4	2,3	-0,1	-4,2	0,0
févr-14	2,9	2,9	2,8	0	0,0	3,6
févr-14	2,4	2,4	2,4	0	0,0	0,0
avr-14	2,6	2,7	2,6	-0,1	-3,7	0,0
juin-14	2,4	2,4	2,4	0	0,0	0,0
juin-14	2,0	2,0	2,0	0	0,0	0,0

#### Incertitude de mesure (EEQ)

Valeur CIQ	2,88
Ecart type CIQ	0,19
Moyenne Biais	0,0000
Ecart type biais	0,0632

#### Niveau 1

<b>Incertitude type</b>	<b>0,20</b>
<b>Incertitude élargie</b>	<b>0,41</b>
<b>Incertitude relative (%)</b>	<b>14,2</b>
<b>Expression</b>	<b>2,88 +/- 0,41</b>
<b>Expression</b>	<b>2,88 +/- 14,2 %</b>

### Niveau 2

#### EEQ

Date	Valeur obtenue	Valeur Pairs	Valeur t tech	Différence	Inexactitude (%)	Inexactitude (% t tech)
août-13	4,3	4,4	4,3	-0,1	-2,3	0,0
avr-14	4,2	4,1	4	0,1	2,4	5,0

#### Incertitude de mesure (EEQ)

Valeur CIQ	7,00
Ecart type CIQ	0,43
Moyenne Biais	0,0000
Ecart type biais	0,1414

#### Niveau 2

<b>Incertitude type</b>	<b>0,45</b>
<b>Incertitude élargie</b>	<b>0,90</b>
<b>Incertitude relative (%)</b>	<b>12,8</b>
<b>Expression</b>	<b>7,00 +/- 0,90</b>
<b>Expression</b>	<b>7,00 +/- 12,8 %</b>

## Inexactitude et incertitude de mesure

<b>Structure</b>	SHB
<b>UF</b>	
<b>Paramètre</b>	Hémoglobine F
<b>Instrument</b>	Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

<b>date</b>	Juin 2013 à juin 2014
<b>Réactifs</b>	UK NEQAS
<b>Unité</b>	%
<b>Commentaires</b>	

### Niveau 1

#### EEQ

Date	Valeur obtenue	Valeur Pairs	Valeur t tech	Différence	Inexactitude (%)	Inexactitude (% t tech)
juin-13	27	27,7	25,2	-0,7	-2,5	7,1
août-13	0,5	0,5	1	0	0,0	-50,0
août-13	0,9	0,9	1,3	0	0,0	-30,8
août-13	0	0,4	0,4	-0,4	-100,0	-100,0
oct-13	0	0,3	0,6	-0,3	-100,0	-100,0
oct-13	0	0,3	0,7	-0,3	-100,0	-100,0
oct-13	12,7	13,2	12,5	-0,5	-3,8	1,6
févr-14	13,3	13,5	12,4	-0,2	-1,5	7,3
févr-14	1,6	2,1	1,9	-0,5	-23,8	-15,8
avr-14	0,5	0,7	1,2	-0,2	-28,6	-58,3
juin-14	27,2	26,9	24,9	0,3	1,1	9,2

#### Incertitude de mesure (EEQ)

Valeur CIQ	24,13
Ecart type CIQ	1,15
Moyenne Biais	-0,2545
Ecart type biais	0,2806

#### Niveau 1

<b>Incertitude type</b>	<b>1,19</b>
<b>Incertitude élargie</b>	<b>2,39</b>
<b>Incertitude relative (%)</b>	<b>9,9</b>
<b>Expression</b>	<b>24,13 +/- 2,39</b>
<b>Expression</b>	<b>24,13 +/- 9,9 %</b>

## Inexactitude et incertitude de mesure

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

Hémoglobine S

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

date Juin 2013 à juin 2014

Réactifs UK NEQAS

Unité %

Commentaires

### Niveau 1

#### EEQ

Date	Valeur obtenue	Valeur Pairs	Valeur t tech	Différence	Inexactitude (%)	Inexactitude (%) t tech
juin-13	29	29,1	27,3	-0,1	-0,3	6,2
août-13	35,7	35,7	33	0	0,0	8,2
oct-13	41	40,5	37,7	0,5	1,2	8,8
oct-13	29,4	28,6	27,3	0,8	2,8	7,7
févr-14	39,2	39,1	36,6	0,1	0,3	7,1
avr-14	40	40,1	37,4	-0,1	-0,2	7,0
juin-14	34	34,2	31,6	-0,2	-0,6	7,6

#### Incertitude de mesure (EEQ)

Valeur CIQ	19,83
Ecart type CIQ	0,69
Moyenne Biais	0,1429
Ecart type biais	0,3690

#### Niveau 1

<b>Incertitude type</b>	<b>0,79</b>
<b>Incertitude élargie</b>	<b>1,58</b>
<b>Incertitude relative (%)</b>	<b>8,0</b>
<b>Expression</b>	<b>19,83 +/- 1,58</b>
<b>Expression</b>	<b>19,83 +/- 8,0 %</b>

Les résultats obtenus (Tableau X) sont très satisfaisants pour chacune de ces trois fractions. En effet, en moyenne, le biais est de 0,0 % pour l'Hb A2 ; - 0,2 % pour l'Hb F et 0,1 % pour l'Hb S. Ces valeurs, toutes inférieures aux spécifications retenues, nous permettent donc de conclure que la méthode d'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> est satisfaisante pour le paramètre concernant l'approche de la justesse.

**Tableau X. Résultats de l'évaluation de l'inexactitude.**

Hémoglobine	Biais moyen calculé	Limite d'acceptabilité	Conclusion
Hb A2	0,0 %	$\pm 0,5$ %	Conforme
Hb F	-0,2 %	$\pm 0,5$ %	Conforme
Hb S	0,1 %	$\pm 1,0$ %	Conforme

### III.2.4. Incertitudes de mesure

Pour toutes les mesures quantitatives réalisées au LBM, l'incertitude de mesure doit être évaluée dans les cas où cela est jugé pertinent et possible, notamment lorsque l'interprétation d'un résultat s'effectue par rapport à une antériorité ou à un seuil de décision clinique (26) (37) (27). Si possible, il est recommandé d'estimer l'incertitude à plusieurs niveaux de concentration, en particulier aux seuils de décision thérapeutique. Selon la norme NF EN ISO 15189, « toutes les composantes de l'incertitude doivent être prises en compte. Les sources contribuant à l'incertitude peuvent inclure l'échantillonnage, la préparation des échantillons, la sélection des aliquotes d'échantillon, les calibrateurs, les matériaux de référence, les grandeurs d'entrée, l'équipement utilisé, les conditions expérimentales, l'état de l'échantillon et les changements de manipulateurs » (1).

Dans le cas de la recherche des anomalies de l'hémoglobine, la connaissance des incertitudes de mesure présentent surtout un intérêt pour les fractions normalement présentes en faible proportion telles que l'Hb A2 et l'Hb F et pour l'Hb S. En effet, l'incertitude de mesure relative à la proportion d'Hb A2 peut aider le clinicien pour sa prise de décision diagnostique alors que celle relative à la proportion d'Hb S est surtout utile dans le cadre de suivis thérapeutiques. Pour l'Hb F, l'incertitude de mesure peut être une aide lors de l'établissement d'un diagnostic mais également dans le cadre d'un suivi thérapeutique.

Pour évaluer les incertitudes de mesure, nous avons utilisé la méthode « CIQ / EEQ » définie dans le document SH GTA 14 (26). Selon cette dernière, l'incertitude type  $u_c$  est calculée comme la racine carrée de la somme quadratique des composantes d'incertitude provenant du CIQ et de l'EEQ (Annexe 12). L'incertitude élargie  $U$  est ensuite obtenue en multipliant l'incertitude-type par un facteur d'élargissement généralement égal à 2. Cela permet d'indiquer que l'intervalle compris entre la valeur mesurée  $\pm U$  a 95 % de chance de contenir la valeur vraie, si la loi de distribution est normale.



Nos résultats, déjà présentés dans les documents ci-dessus relatifs à l'inexactitude, sont résumés dans le tableau XI.

**Tableau XI. Résultats de l'évaluation des incertitudes de mesure.**

Hémoglobine	Hb A2		Hb F	Hb S
Valeur CIQ (%)	2,88 (Niveau 1)	7,00 (Niveau 2)	24,13	19,83
Incertitude-type (%)	0,20	0,45	1,19	0,79
Incertitude élargie (%)	0,40	0,90	2,38	1,58
Incertitude relative (%)	14,2	12,8	9,9	8,0
Expression du résultat	2,88 ± 0,40	7,00 ± 0,90	24,13 ± 2,38	19,83 ± 1,58

Ces valeurs d'incertitudes de mesure nous semblent parfaitement adaptées pour une interprétation éclairée des résultats.

### III.2.5. Intervalle de mesure

Selon le SH GTA 04, l'intervalle de mesure, défini par le domaine situé entre la limite de quantification et la limite supérieure de linéarité, est à vérifier sur site en portée de type A si cela s'avère nécessaire. Comme nous l'avons déjà expliqué, nous avons estimé non utile la détermination de l'intervalle de mesure sur site en raison d'une étendue relativement faible de valeurs possibles. Cependant, dans la bibliographie, on retrouve plusieurs études dans lesquelles les limites de linéarité et/ou la limite de quantification ont été établies sur un instrument d'électrophorèse capillaire Sebia.

Tout d'abord, dans la fiche technique du fournisseur, les résultats relatifs à l'étude de linéarité montrent que, après analyse de trois sangs caractéristiques différents dilués en série dans de l'eau physiologique, la technique MINICAP HEMOGLOBIN(E) est parfaitement linéaire dans la gamme des concentrations étudiées entre 1,5 et 21,7 g/dL d'hémoglobine totale. Les pourcentages des fractions de l'hémoglobine sont indépendants de la concentration en hémoglobine totale.

D'autre part, plusieurs mélanges de deux échantillons différents en proportions variables ont été analysés. Ils ont permis de conclure que le pourcentage de chaque fraction de l'hémoglobine étudiée (Hb A, Hb F, Hb S et Hb A2) est parfaitement corrélé à la proportion de chacune des fractions dans ces mélanges et que toute variation est détectée de manière linéaire. Cette parfaite linéarité a été démontrée dans la gamme des concentrations étudiées, soit pour l'Hb A2 jusqu'à un maximum de l'ordre de 1,4 g/dL (entre 0,0 et 10,0 % d'Hb A2), pour l'Hb F jusqu'à un maximum de 17,3 g/dL (entre 0,0 et 80,0 % d'Hb F) et pour l'Hb S jusqu'à un maximum de 10,3 g/dL (entre 0,0 et 87,0 % d'Hb S).

En 2008, Winichagoon *et al.* a évalué la linéarité sur le système Capillarys® pour l'Hb A2 et l'Hb F en analysant des mélanges d'un échantillon de sang de cordon normal (Hb F = 85 %, Hb A = 14,1 % et Hb A2 indétectable) et d'échantillon de sang prélevé chez un adulte sain (Hb A2 = 3,3 %, Hb A = 87,7 % et Hb F indétectable) (90). Huit mélanges de ces deux échantillons ont ainsi été préparés en double et analysés. Les résultats ont été interprétés à l'aide d'un graphe représentant les valeurs obtenues pour l'Hb F en fonction des valeurs obtenues pour l'Hb A2 dans chaque mélange. Une droite de régression linéaire a été tracée et a montré que la relation entre l'Hb A2 et l'Hb F est linéaire ( $r^2 = 0,9893$ ).

Cette équipe a également déterminé les limites de quantification pour l'Hb A2 et l'Hb F, celles-ci étant définies comme les plus petites concentrations d'Hb A2 ou d'Hb F pouvant être quantifiées de manière reproductible (CV < 10 %). Pour déterminer la limite de quantification de l'Hb F, ils ont analysé à plusieurs reprises des dilutions en série d'un mélange de culot globulaire d'un sang de cordon normal (Hb F = 89,1 %, Hb A = 10,9 %) avec un culot globulaire d'un sang adulte normal dépourvu d'Hb F (Hb A = 97,9 %, Hb A2 = 2,1 %). Les concentrations moyennes en Hb F dans les dilutions en série, et leur CV correspondant, étaient les suivants (Tableau XII) :

**Tableau XII. Détermination de la limite de quantification de l'Hb F sur Capillarys® réalisée par Winichagoon *et al.***

Concentration moyenne d'Hb F (%)	8,9	5,3	2,7	1,6	0,8
CV (%)	8	8	4	6	13

La limite de quantification de l'Hb F a donc été retenue à 1,6 %, plus petite concentration d'Hb F pour laquelle le CV calculé est inférieur à 10 %.

La limite de quantification de l'Hb A2 a été déterminée selon le même principe, en utilisant des dilutions en série d'un mélange de culot globulaire d'un sang adulte normal avec un culot globulaire d'un sang de cordon normal, ce dernier étant dépourvu d'Hb A2. Les concentrations moyennes en Hb A2 et leur CV correspondant étaient les suivants (Tableau XIII) :

**Tableau XIII. Détermination de la limite de quantification de l'Hb A2 sur Capillarys® réalisée par Winichagoon *et al.***

Concentration moyenne d'Hb A2 (%)	2,8	1,5	1,1	0,5
CV (%)	2	5	6	13

La valeur de 1,1 % a donc été considérée comme la limite de quantification de l'Hb A2. Par ailleurs, cette étude conforte les résultats que nous avons rapportés précédemment indiquant une meilleure précision pour les taux faibles d'Hb A2 que pour ceux d'Hb F.

Dans sa publication de 2012, Agouti *et al.* a évalué la linéarité sur Capillarys Flex Piercing® en analysant 11 échantillons, contenant des concentrations variées d'Hb A2 et d'Hb F, trois fois de suite chacun (2). Ces 11 échantillons ont été préparés en mélangeant différents volumes d'un hémolysat « bas niveau » (Hb A2 = 2 %, Hb F = 0,7 %) et d'un hémolysat « haut niveau » (Hb A2 = 6,6 %, Hb F = 6,1 %). Agouti *et al.* conclut en une bonne linéarité observée pour l'Hb A2 (pour des concentrations moyennes entre 2,2 et 6,2 %) et pour l'Hb F (pour des concentrations moyennes entre 0,6 et 6,5 %).

Greene *et al.* a également étudié la linéarité pour l'Hb A2 et l'Hb F sur Capillarys Flex® en 2012 (39). Pour cela, il a mélangé des échantillons de haute concentration avec des échantillons de faible concentration de manière à obtenir 5 échantillons, pour l'Hb A2, et 8 échantillons, pour l'Hb F, contenant des concentrations variées dans une gamme pertinente sur le plan clinique. Les concentrations en Hb A2 obtenues dans ces mélanges s'étendaient de 1,4 % à 6,3 %, celles de l'Hb F allaient de 0 % à 20,2 %. Chaque échantillon a été analysé 3 fois de suite. A l'issue de ces analyses, Greene *et al.* a conclu en une linéarité acceptable à la fois pour l'Hb A2 et pour l'Hb F.

Toutes ces études que nous avons pu consulter dans la littérature confortent une linéarité acceptable du système Minicap® dans la gamme des concentrations possibles pour chaque fraction d'hémoglobine.

### III.2.6. Contamination inter-échantillons

L'étude de contamination inter-échantillons est à mener pour les méthodes automatisées et plus particulièrement les paramètres réputés sensibles à l'influence d'une contamination. Elle permet notamment de vérifier le bon fonctionnement du système de lavage et/ou de décontamination.

Dans la publication de Agouti *et al.* portant sur l'évaluation analytique du Capillarys 2 Flex Piercing®, la contamination inter-échantillons susceptible d'interférer sur la quantification de l'Hb A2 a été évaluée en analysant trois fois de suite un échantillon pathologique (contenant de l'Hb S ou de l'Hb C) suivi par un échantillon normal (2). Ces séquences ont été répétées quatre fois. A l'issue de cet essai, aucune contamination inter-échantillons portant sur la mesure d'Hb A2 n'a été mise en évidence. Sur Capillarys 2 Flex Piercing®, toutes les fractions glyquées migrent dans la même zone et forment un seul pic principal. Cette absence de séparation des différentes fractions glyquées permet une quantification précise de l'Hb A2 et offre un profil clair et simple à interpréter.

Comme rapporté dans un article publié en 2012, Greene *et al.* a évalué la contamination inter-échantillons sur Capillarys Flex®, à la fois pour le système de perçage de bouchons, qui permet l'analyse sur tubes de sang total bouchés, et à la fois pour le système Capillarys® qui nécessite des échantillons de culot globulaire dépourvus de bouchons (39). Pour le système de perçage de bouchons, 5 échantillons avec Hb F élevée (de l'ordre de 20 %) ont été analysés

suivis de 2 séries de 5 échantillons avec Hb F basse (<1 %). Pour le système Capillarys®, 8 échantillons de patients (1 par capillaire) contenant au moins une hémoglobine anormale (Hb C, S ou E) ont été analysés suivis de 8 échantillons normaux. Pour l'un comme pour l'autre de ces deux systèmes, aucune contamination inter-échantillons n'a été détectée.

L'hémoglobine S et l'hémoglobine F font partie des paramètres pouvant être considérés comme sensibles et les plus fréquemment retrouvés en proportion importante. On retrouve notamment de fortes concentrations d'hémoglobine S lors de drépanocytoses homozygotes ou trait drépanocytaire associé à une bêta-thalassémie. Quant à l'hémoglobine F, des taux élevés sont notamment présents chez les nouveau-nés, lors de bêta-thalassémies majeures, lors de syndromes de Persistance Héritaire de l'Hémoglobine Fœtale, ou chez les patients drépanocytaires traités par hydroxyurée (Hydrea® ou Siklos®) qui induit une augmentation de l'hémoglobine F.

Nous avons choisi d'évaluer la contamination inter-échantillons en utilisant un échantillon contenant une forte proportion d'Hb S, certainement le paramètre le plus sensible. Aussi, d'un point de vue pratique, il était plus aisé de trouver un échantillon avec une forte proportion d'Hb S et de volume suffisant pour réaliser l'étude de contamination inter-échantillons, plutôt qu'un échantillon avec une forte proportion d'Hb F. En effet, de fortes quantités d'Hb F sont principalement retrouvées dans les échantillons pédiatriques, dont les volumes sont souvent très faibles. Pour estimer une éventuelle contamination inter-échantillons, nous avons donc analysé 3 fois de suite un échantillon contenant une forte proportion d'Hb S (35,5 % en moyenne) puis 3 fois de suite un échantillon dépourvu d'Hb S. Ceci conduit alors à obtenir 3 valeurs H1, H2 et H3, de moyenne mH, pour le taux d'Hb S dans le premier échantillon et 3 valeurs B1, B2 et B3 pour le taux d'Hb S dans le deuxième échantillon, celles-ci étant théoriquement nulles. Cette séquence a été répétée 5 fois afin de calculer la moyenne des B1 (mB1) et la moyenne des B3 (mB3), permettant alors le calcul suivant :

$$\text{Contamination en \%} = (mB1 - mB3) / (mH - mB3) \times 100$$

Un test « t » de Student est ensuite utilisé afin de démontrer si la différence entre les 2 moyennes mB1 et mB3 est statistiquement significative ou non.

Dans notre cas, toutes les valeurs B1 et B3 étaient égales à zéro, démontrant immédiatement l'absence de contamination inter-échantillons pour de fortes quantités d'Hb S, et rendant le test « t » de Student inutilisable et non nécessaire.

L'Hb S étant considérée comme le paramètre le plus sensible et le système de lavage étant identique quelles que soient les fractions d'hémoglobine, on peut considérer qu'il n'existe pas de contamination inter-échantillons pour l'ensemble des hémoglobines.

## Etude de la Contamination inter-échantillons

<b>Structure</b>	SHB
<b>UF</b>	
<b>Paramètre</b>	Hémoglobine S
<b>Instrument</b>	Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

<u>date</u>	24/05/2012
<u>Echantillon "haut"</u>	Hémoglobine S élevée
<u>Echantillon "bas"</u>	Absence d'hémoglobine S
<u>Réactifs :</u>	
<u>Unités</u>	%

B1	B3
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0

Echantillons haut :

	Moyenne
H1	35,28
H2	35,52
H3	35,78

Echantillon bas :

	Moyenne
B1	0
B2	0
B3	0

Formule de calcul de la contamination (SH GTA 04) :

$$C = (mB1 - mB3) / (mH - mB3) * 100$$

**Contamination (%)      Test t**

**C = 0,0      p= #####**

	Données
H1	35,6
H2	35,9
H3	36,1
B1	0
B2	0
B3	0
H1	35,3
H2	35,3
H3	35,5
B1	0
B2	0
B3	0
H1	35,1
H2	35,4
H3	35,5
B1	0
B2	0
B3	0
H1	35
H2	35,5
H3	35,7
B1	0
B2	0
B3	0
H1	35,4
H2	35,5
H3	36,1
B1	0
B2	0
B3	0

### III.2.7. Intervalle de référence

Les valeurs de référence biologiques sont vérifiées si possible par la bibliographie et/ou par calcul statistique (48).

Le fournisseur Sebia recommande les valeurs de référence suivantes :

Hb A : 96,8 – 97,8 %

Hb A2 : 2,2 – 3,2 %

Hb F : < 1 %

Dans la littérature, plusieurs publications font état de valeurs de référence déterminées expérimentalement.

Ainsi, Yang *et al.* a établi en 2009 son propre intervalle de référence pour l'Hb A2 sur Capillarys® (92). Pour ce faire, il a réalisé l'électrophorèse de l'hémoglobine sur 103 échantillons provenant de patients sains, avec des indices érythrocytaires (nombre de globules rouges, Hb, VGM, CCMH et TCMH) normaux. L'intervalle de référence pour l'Hb A2 obtenu était 1,7 – 3,2 %, avec une moyenne de 2,62 % et un écart-type de 0,29 %. Ceci lui a permis de valider les résultats publiés en 2006 par Louahabi *et al.* (65), qui annonçait un intervalle de référence de 2,1 à 3,1 %, ainsi que les recommandations du fournisseur. Il a alors choisi comme intervalle de référence pour l'Hb A2 entre 1,5 et 3,2 %.

De même, Kim *et al.* a évalué l'intervalle de référence pour l'Hb A2 sur Minicap® en analysant 40 échantillons pour lesquels les indices érythrocytaires étaient inclus dans les valeurs de référence (55). Il a alors fixé ses intervalles de référence à 96,8 – 97,8 % pour l'Hb A, <1 % pour l'Hb F et 2,2 – 3,5 % pour l'Hb A2.

En 2012, Greene *et al.* a également déterminé l'intervalle de référence pour l'Hb A2 sur le Capillarys Flex® (39). Ceci a été réalisé en analysant 126 échantillons sanguins, provenant de 61 personnes de sexe masculin et 65 personnes de sexe féminin âgées de 10 à 70 ans. Tous ces échantillons avaient des taux d'Hb, hématocrite et VGM dans les valeurs normales. L'équipe de Greene *et al.* a d'abord choisi d'établir les valeurs de référence séparément pour le groupe masculin et le groupe féminin. Ne constatant aucune différence de répartition des valeurs d'Hb A2 entre les deux groupes, un seul intervalle de référence a donc finalement été déterminé et retenu comme inférieur à 3,2 %.

Nous avons également choisi d'établir nos propres valeurs de référence expérimentalement pour l'Hb A2 en réalisant l'électrophorèse de l'hémoglobine sur le système Minicap® à partir de 60 témoins sans différencier les sexes, la plupart provenant de donneurs de sang. En effet, l'Hb A2 est un paramètre particulièrement important pour l'interprétation du profil électrophorétique, une diminution ou, à l'inverse, une augmentation de son taux pouvant être le signe d'une anomalie de l'hémoglobine (36). Sa concentration étant faible à l'état normal, il est nécessaire qu'elle puisse être quantifiée précisément. Ceci a

été démontré précédemment par les études de répétabilité et de fidélité intermédiaire, dans lesquelles les CV calculés étaient toujours inférieurs aux spécifications choisies, quel que soit le niveau de concentration. Enfin, pour une bonne interprétation de la valeur d'Hb A2 dans un échantillon, il est important de connaître les valeurs limites au-delà desquelles elle ne doit plus être considérée comme normale, d'où la nécessité d'établir un intervalle de référence.

L'électrophorèse de l'hémoglobine n'a été programmée qu'après avoir réalisé sur chaque échantillon un hémogramme afin d'éliminer ceux présentant des valeurs anormales de la numération érythrocytaire (Hb, VGM, CCMH, TCMH). Cela a permis notamment de ne pas utiliser comme témoin un patient présentant une anémie par carence martiale, correspondant à une anémie microcytaire hypochrome (diminution des paramètres érythrocytaires : Hb, VGM, CCMH, TCMH). D'autre part, les échantillons présentant un profil électrophorétique anormal ont été exclus. De ce fait, sur les 66 échantillons recueillis au départ, 6 d'entre eux ont dû être éliminés et nous avons établi notre propre intervalle de référence à partir de 60 valeurs. Ce groupe de témoins a été choisi de manière à être relativement représentatif de la population. Ainsi, sur les 60 personnes dont l'échantillon a été retenu, 26 (soit 43,3 %) sont des femmes et 34 (soit 56,7 %) sont des hommes ; et les âges représentés s'étendent de 21 à 66 ans.

Nous obtenons alors une moyenne ( $m$ ) de 3,12 % pour l'Hb A2, avec un écart-type ( $s$ ) de 0,26. D'après le SH GTA 04, toutes les valeurs inférieures à ( $m - 2s$ ) et supérieures à ( $m + 2s$ ) doivent être écartées. Autrement dit, nous devons écarter toutes les valeurs inférieures à 2,60 % et celles supérieures à 3,64 %. Une valeur entrant dans ce cas de figure a donc été éliminée (Hb A2 évaluée à 3,7 %). En ne tenant pas compte de cette valeur, on recalcule la moyenne (moyenne tronquée)  $m_t$  et l'écart-type (écart-type tronqué)  $s_t$ . Les valeurs de référence seront données par l'intervalle  $[m_t - 2 s_t ; m_t + 2 s_t]$ . Ainsi, pour une moyenne tronquée  $m_t$  recalculée à 3,11 % et un écart-type tronqué  $s_t$  à 0,25 ; on détermine un intervalle de référence pour l'Hb A2 de 2,6 – 3,6 %. Les valeurs ainsi obtenues expérimentalement sont légèrement supérieures à celles annoncées par le fournisseur, soit 2,2 – 3,2 %. Celles-ci pourront faire l'objet d'un réajustement ultérieur en fonction d'éventuelles interprétations de valeurs d'Hb A2 qui mèneraient à des conclusions inadaptées.

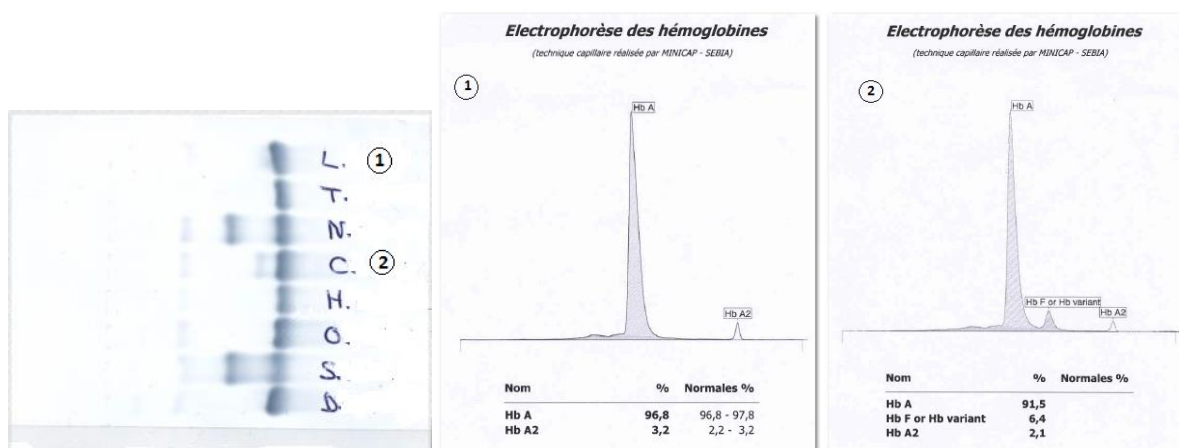
Lors de l'interprétation d'un profil électrophorétique, le taux d'Hb F présente également une certaine importance pour le diagnostic des hémoglobinopathies. Cependant, dans le cas de l'Hb F, les valeurs de référence étant inférieures à 1 %, il n'a pas été possible de calculer l'écart-type et donc l'intervalle de référence. Nous nous sommes simplement assurés que les valeurs d'Hb F étaient toutes inférieures à 1 % chez les sujets témoins. Cette condition a bien été vérifiée pour les 60 échantillons, validant ainsi la valeur de référence pour l'Hb F retenue comme inférieure à 1 %.

Le pourcentage d'Hb A étant complémentaire des autres hémoglobines et ne constituant pas un paramètre primordial dans l'interprétation des profils électrophorétiques, et notamment dans le diagnostic des hémoglobinopathies, nous avons choisi de ne pas déterminer expérimentalement un intervalle de référence pour l'Hb A. L'intervalle de référence retenu est donc complémentaire de celui obtenu pour l'Hb A2, c'est-à-dire 96,4 – 97,4 %.

### III.2.8. Corrélation avec la méthode déjà utilisée : l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin

L'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> (Sebia), technique quantitative, vient remplacer une technique manuelle qualitative, et non quantitative, d'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin (plaques Helena BioSciences, TITAN III-H ; tampon SUPRE HEME buffer). L'étude de corrélation entre ces deux méthodes a donc simplement visé à s'assurer de l'identification équivalente des différentes fractions d'hémoglobine par les deux techniques, sans tenir compte de la quantification. Nous avons donc comparé le profil électrophorétique obtenu sur plaque d'acétate de cellulose Helena avec le profil électrophorétique obtenu par Minicap<sup>®</sup> pour chacun des échantillons analysés au laboratoire durant la période du 14/05/2013 au 23/07/2013, représentant un total de 97 échantillons comparés. Parmi eux, 12 échantillons comportaient de l'hémoglobine S, 2 échantillons comportaient de l'hémoglobine C et 2 échantillons comportaient de l'hémoglobine D.

Aucune différence n'a été observée entre les deux types de profils pour l'ensemble des échantillons, les bandes obtenues sur la plaque d'acétate de cellulose étant toutes retrouvées sous formes de pics sur le tracé de l'électrophorèse capillaire. La détection des variants de l'hémoglobine était identique entre les deux méthodes, avec de façon attendue une meilleure résolution de l'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> pour la détection de l'hémoglobine F (Figure 17). Pour un échantillon, la plaque d'acétate de cellulose semblait même présenter une légère bande en hémoglobine F, ce qui a été infirmé par CLHP (BioRad D-10<sup>®</sup>) et électrophorèse capillaire. La plaque d'acétate de cellulose présente en effet l'inconvénient d'une détection visuelle opérateur-dépendant, s'accompagnant nécessairement de problèmes de sensibilité, spécificité et reproductibilité.



**Figure 17. Illustration de la comparaison entre l'électrophorèse sur acétate de cellulose et l'électrophorèse capillaire pour un patient 1 présentant un profil normal et pour un patient 2 présentant une augmentation de l'Hb F.**

Ces données ont largement permis de valider le remplacement de la méthode d'électrophorèse sur acétate de cellulose par l'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup>.



### III.3. COMPARAISON DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE MINICAP<sup>®</sup> (SEBIA) AVEC LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE DE HAUTE PERFORMANCE D-10<sup>®</sup> (BIORAD)

#### III.3.1. Résultats

Selon le SH GTA 04, lors d'une vérification de méthode sur site en portée de type A, une comparaison de cette nouvelle méthode avec une méthode déjà utilisée au laboratoire doit être réalisée (25). L'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> (Sebia), en remplacement de la technique d'électrophorèse sur acétate de cellulose, sera désormais retenue pour la recherche des anomalies de l'hémoglobine, couplée à la CLHP D-10<sup>®</sup> (BioRad). Il est donc nécessaire de comparer ces deux méthodes de séparation et de quantification de l'hémoglobine utilisées au laboratoire.

La comparaison de deux méthodes se fait par l'analyse d'au moins 30 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré. Ces échantillons, frais de préférence, sont analysés en simple par les deux techniques, dans un délai le plus court possible. Les résultats sont examinés au fur et à mesure et on vérifie si les discordances, c'est-à-dire les écarts entre les deux méthodes, sont supérieures ou non aux limites de suivi calculées préalablement selon la formule suivante :

$$\text{Limites de suivi} = \pm \sqrt{(3 \sigma_{\text{FI technique testée}})^2 + (3 \sigma_{\text{FI technique de comparaison}})^2}$$

où  $\sigma_{\text{FI}}$  correspond à l'écart-type de la fidélité intermédiaire (FI).

Pour comparer les résultats d'une méthode Y à tester avec ceux d'une méthode X (utilisée au laboratoire, comme dans notre cas, ou prise comme référence), trois types de graphes sont tracés :

- Régression linéaire : Y en fonction de X
- Diagramme des différences : Y - X en fonction de X
- Diagramme des rapports : Y / X en fonction de X

Dans le cas présent, la méthode X correspond donc à la CLHP D-10<sup>®</sup> et la méthode Y à l'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup>.

En cas de discordances significatives observées entre les deux méthodes pour un échantillon, une recherche de la cause de cette discordance doit être effectuée si elle persiste après vérification.

Le diagramme des différences est aussi appelé diagramme de Bland et Altman. Martin Bland et Douglas Altman ont publié en 1986, dans *The Lancet*, un article proposant une méthode de comparaison de deux séries de valeurs quantitatives, celle-ci correspondant à une mesure de concordance (16). C'est ainsi qu'ils ont popularisé le diagramme des différences dans le milieu de la recherche clinique. La régression linéaire et l'étude de concordance sont

deux techniques complémentaires étudiant les relations entre deux séries de valeurs quantitatives. La régression linéaire, avec calcul du coefficient de corrélation, ne s'applique qu'à des variables indépendantes. Or dans le cas d'une comparaison de méthodes, les deux variables étudiées ne sont pas indépendantes. La valeur du coefficient de corrélation ne peut donc pas être utilisée et ne présente donc pas d'intérêt. En revanche, il est intéressant de déterminer l'équation de la droite de régression, dont la pente et l'ordonnée à l'origine permettront d'estimer l'intensité de la liaison entre les deux méthodes comparées. Les deux méthodes présenteront une parfaite corrélation pour une pente égale à 1 et une ordonnée à l'origine égale à 0. Le coefficient de corrélation permet donc de mesurer l'intensité de la liaison entre deux variables et non leur concordance. En effet, deux méthodes peuvent être fortement corrélées mais discordantes en raison d'un biais important entre elles (40) (17) (53).

Nous avons donc comparé les résultats obtenus par électrophorèse capillaire Minicap® (Sebia) avec ceux obtenus par CLHP D-10® (BioRad) sur une période allant de mars à novembre 2012. Tous les échantillons de patients reçus durant cette période ont été analysés à la fois par le système Minicap® et par le système D-10® dans la même journée. Nous avons ainsi pu comparer ces deux techniques pour les Hb A2, Hb F, Hb S, Hb C et Hb E à différents niveaux de concentration, ainsi que pour des variants plus rares comme l'Hb H, l'Hb Constant Spring (CS) ou encore l'Hb D. Toutefois, si cette comparaison a pu être réalisée pour l'Hb A2, l'Hb F et l'Hb S avec un nombre satisfaisant d'échantillons et couvrant bien l'étendue du domaine physiopathologique rencontré, il n'en est pas de même pour les Hb C, Hb E, Hb D, Hb H et Hb Constant Spring, ces variants étant bien plus rares dans la population recrutée au CHU de Nancy.

Le tableau ci-dessous (Tableau XIV) consigne le nombre de valeurs recueillies pour chaque fraction d'Hb, ainsi que le domaine couvert pour chacune, représenté par la valeur la plus basse et la valeur la plus haute obtenues sur Minicap® pour chacune des fractions.

**Tableau XIV. Données recueillies pour chaque hémoglobine lors de l'étude de comparaison Minicap® / D-10® (les valeurs minimales et maximales étant celles obtenues par le système Minicap®).**

Hémoglobine	Hb A2	Hb F	Hb S	Hb C	Hb E	Hb D	Hb H	Hb Cst Spring
Nb de valeurs	258	139	77	3	4	3	2	2
Minimum (%)	0,2	0,0	7,0	33,0	25,0	43,3	11,9	2,9
Maximum (%)	6,8	90,7	94,0	36,0	30,0	50,0	17,4	4,2

Les résultats de la comparaison sont présentés graphiquement ci-dessous, ceux-ci n'étant significatifs que pour les Hb A2, Hb F et Hb S pour lesquelles le nombre de valeurs est suffisamment important (supérieur à 30).

## Comparaison de techniques

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

HbA2

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

Date	mars à novembre 2012
Technique X (ref)	D-10 Biorad (CLHP)
Technique Y	Minicap Sebia (EC)
Unité	%
Echantillon	
Commentaires	

### Résultats statistiques

	Technique X (ref)	Technique Y
Moyenne	2,9	3,1
Minimum	0,20	0,20
Maximum	6,70	6,80
Nb valeurs	258	258
	Différences Y - X	Différences relatives (%)
Moyenne	0,2	9,1

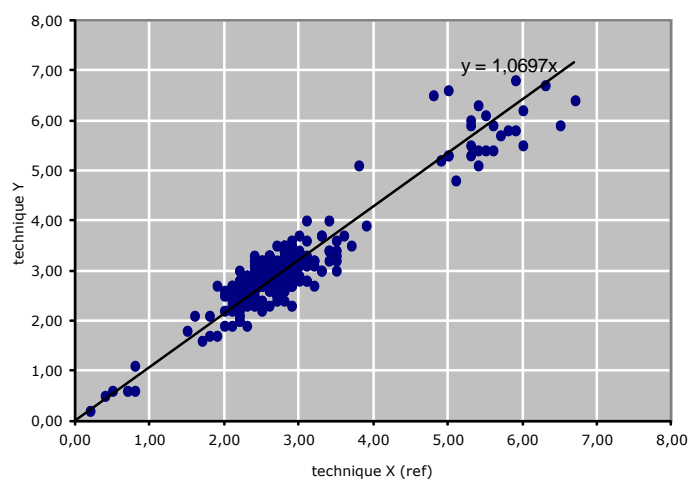
### Corrélation : $Y = aX + b$

Pente (a)	0,98
Ordonnée Origine (b)	0,30

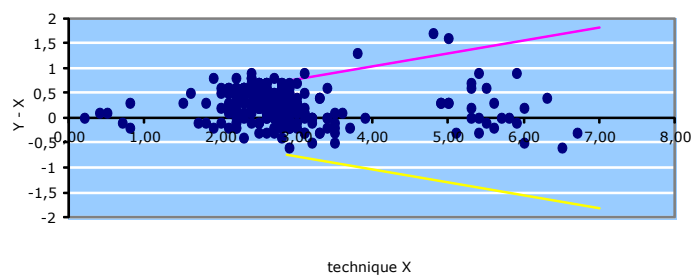
### Limites de suivi

C	s	LS (+)	LS (-)
2,88	0,19	0,736	-0,736
7,00	0,43	1,807	-1,807
Ecart-type FI méthode de référence (si différents)			
Niveau 1	0,13		
Niveau 2	0,15		
Niveau 3			

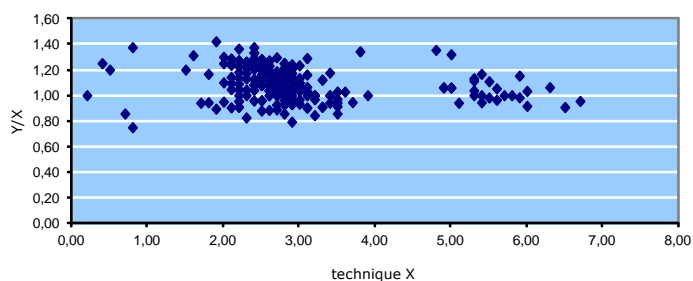
### Regression linéaire



### Diagramme des différences



### Diagramme des rapports



## Comparaison de techniques

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

HbF

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

Date	mars à novembre 2012
Technique X (ref)	D-10 Biorad (CLHP)
Technique Y	Minicap Sebia (EC)
Unité	%
Echantillon	
Commentaires	

### Résultats statistiques

	Technique X (ref)	Technique Y
Moyenne	19,2	18,8
Minimum	0,80	0,00
Maximum	92,10	90,70
Nb valeurs	139	139
	Différences Y - X	Différences relatives (%)
Moyenne	-0,4	-20,5

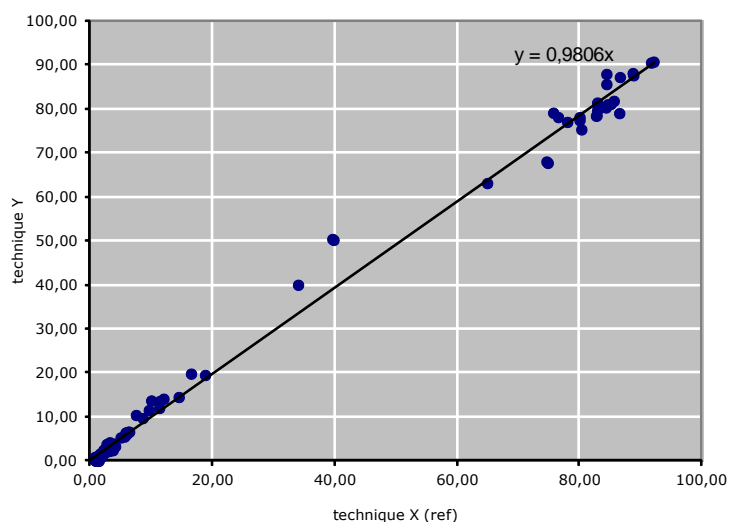
### Corrélation : $Y = aX + b$

Pente (a)	0,98
Ordonnée Origine (b)	0,02

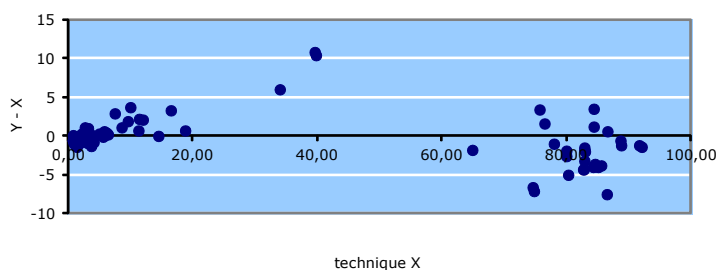
### Limites de suivi

	C	s	LS (+)	LS (-)
	24,13	1,15	3,815	-3,815
Ecart-type FI méthode de référence (si différents)		0,54		
Niveau 1				
Niveau 2				
Niveau 3				

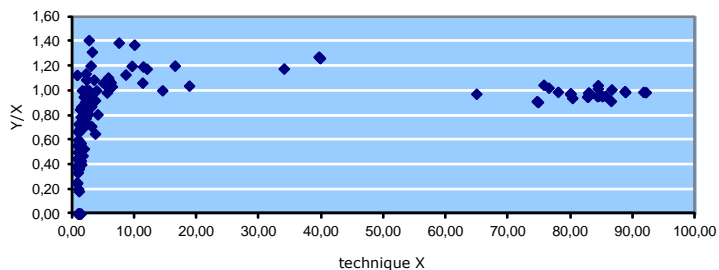
### Regression linéaire



### Diagramme des différences



### Diagramme des rapports



# 

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

HbS

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

Date mars à novembre 2012

Technique X (ref) D-10 Biorad (CLHP)

Technique Y Minicap Sebia (EC)

Unité %

Echantillon

Commentaires

### Résultats statistiques

	Technique X (ref)	Technique Y
<b>Moyenne</b>	37,8	41,4
<b>Minimum</b>	8,00	7,00
<b>Maximum</b>	91,00	94,00
<b>Nb valeurs</b>	77	77

	Différences Y - X	Différences relatives (%)
<b>Moyenne</b>	3,6	10,4

**Corrélation :  $Y = aX + b$**

**Pente (a)** 1,04

**Ordonnée Origine (b)** 2,23

### Limites de suivi

C	s	LS (+)	LS (-)
19,83	0,69	3,042	-3,042
Ecart-type FI méthode de référence (si différents)			
Niveau 1	0,74		
Niveau 2			
Niveau 3			

Regression linéaire

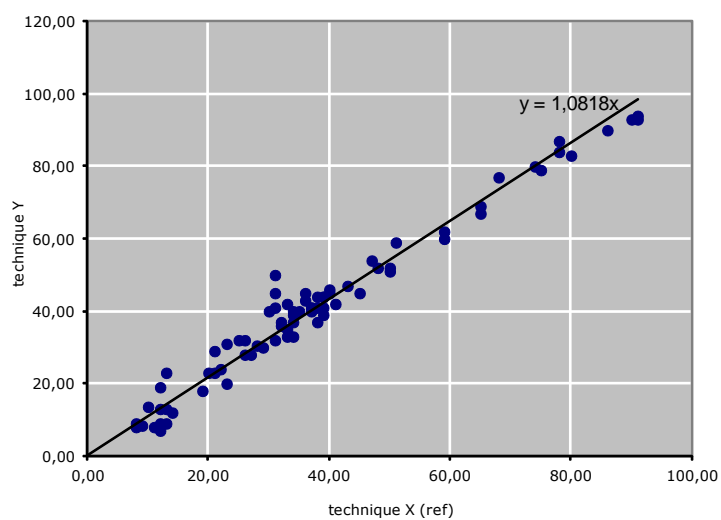


Diagramme des différences

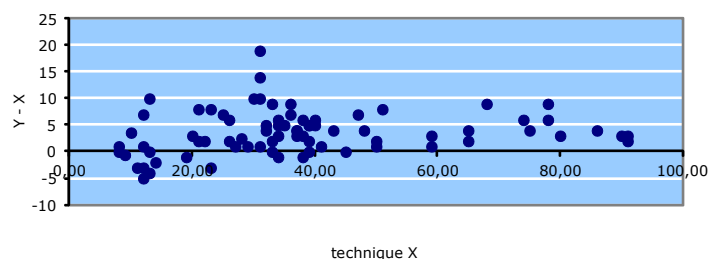
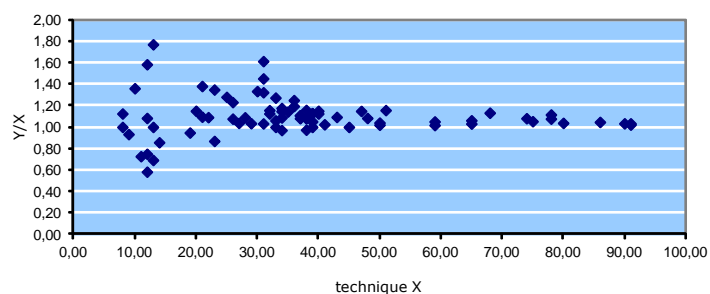


Diagramme des rapports



## Comparaison de techniques

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

HbC

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

Date	mars à novembre 2012
Technique X (ref)	D-10 Biorad (CLHP)
Technique Y	Minicap Sebia (EC)
Unité	%
Echantillon	
Commentaires	

### Résultats statistiques

	Technique X (ref)	Technique Y
Moyenne	34,3	34,3
Minimum	32,00	33,00
Maximum	38,00	36,00
Nb valeurs	3	3

	Différences Y - X	Différences relatives (%)
Moyenne	0,0	0,6

### Corrélation : $Y = aX + b$

Pente (a)	-0,02
Ordonnée Origine (b)	34,89

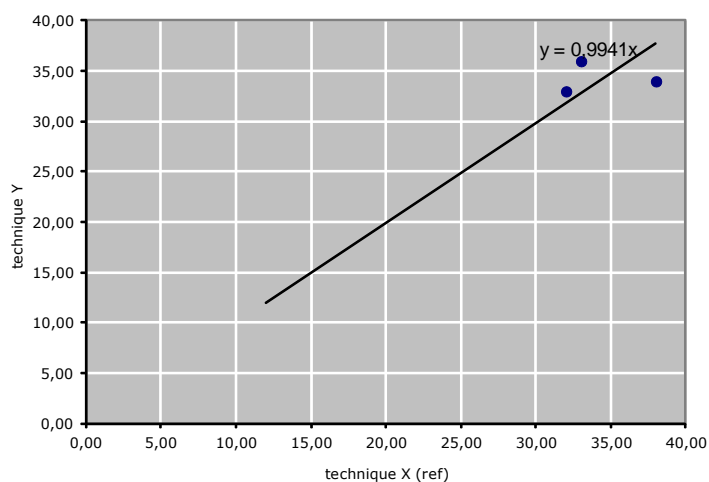
### Limites de suivi

C	s	LS (+)	LS (-)
6,86	0,53	2,264	-2,264

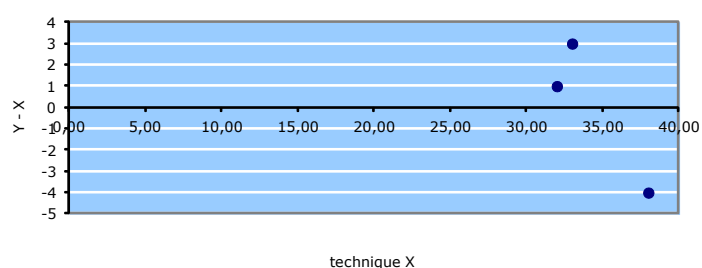
Ecart-type FI méthode de référence (si différents)

Niveau 1	
Niveau 2	
Niveau 3	

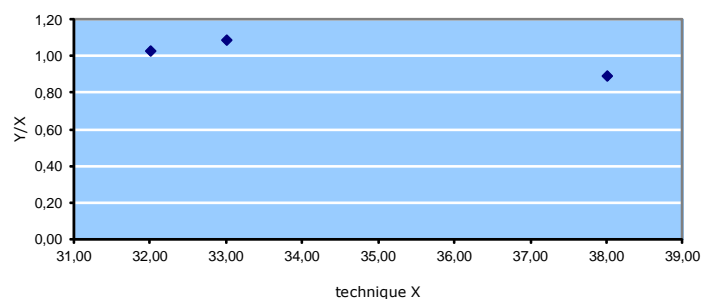
### Regression linéaire



### Diagramme des différences



### Diagramme des rapports



## Comparaison de techniques

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

HbE

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

Date mars à novembre 2012

Technique X (ref) D-10 Biorad (CLHP)

Technique Y Minicap Sebia (EC)

Unité %

Echantillon

Commentaires

### Résultats statistiques

	Technique X (ref)	Technique Y
<b>Moyenne</b>	<b>31,3</b>	<b>26,5</b>
<b>Minimum</b>	<b>29,00</b>	<b>25,00</b>
<b>Maximum</b>	<b>32,00</b>	<b>30,00</b>
<b>Nb valeurs</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

	Différences Y - X	Différences relatives (%)
<b>Moyenne</b>	<b>-4,8</b>	<b>-15,2</b>

**Corrélation :  $Y = aX + b$**

**Pente (a) 0,67**

**Ordonnée Origine (b) 5,67**

### Limites de suivi

C	s	LS (+)	LS (-)
Ecart-type FI méthode de référence (si différents)			
Niveau 1			
Niveau 2			
Niveau 3			

Regression linéaire

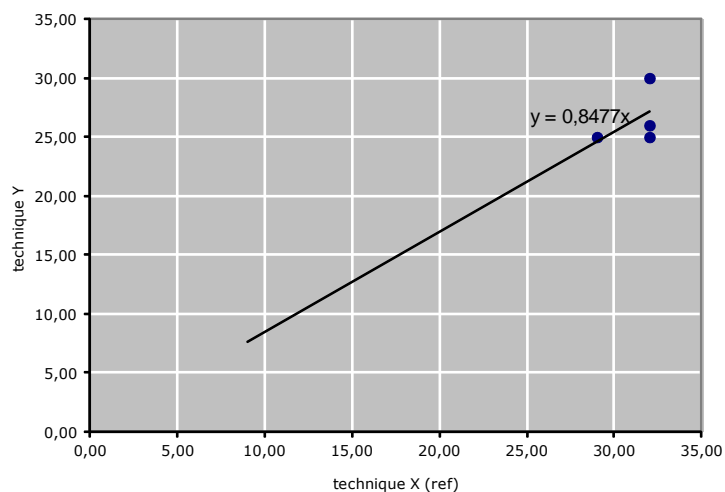


Diagramme des différences

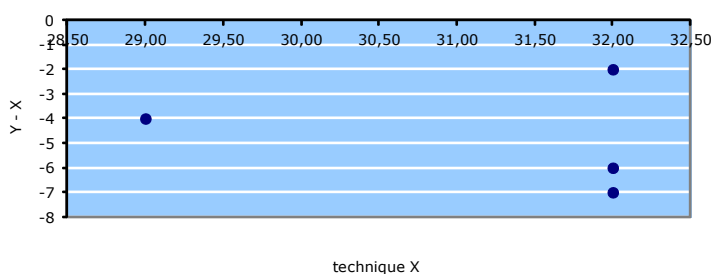
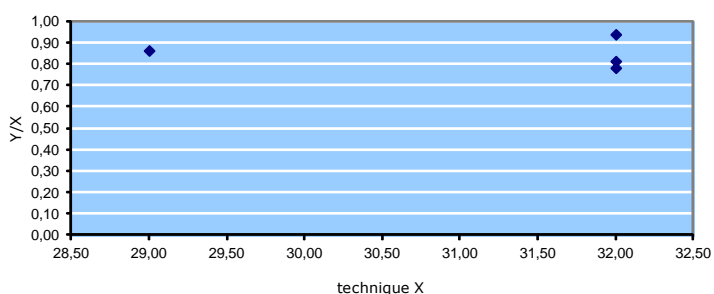


Diagramme des rapports



# Comparaison de techniques

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

HbD

**Instrument**

Minicap Sebia

## Informations sur les conditions du test

Date mars à novembre 2012

Technique X (ref) D-10 Biorad (CLHP)

Technique Y Minicap Sebia (EC)

Unité %

Echantillon

Commentaires

## Résultats statistiques

	Technique X (ref)	Technique Y
<b>Moyenne</b>	<b>39,3</b>	<b>45,8</b>
<b>Minimum</b>	<b>38,00</b>	<b>43,30</b>
<b>Maximum</b>	<b>41,00</b>	<b>50,00</b>
<b>Nb valeurs</b>	<b>3</b>	<b>3</b>

	Différences Y - X	Différences relatives (%)
<b>Moyenne</b>	<b>6,4</b>	<b>16,2</b>

**Corrélation :  $Y = aX + b$**

<b>Pente (a)</b>	<b>2,34</b>
<b>Ordonnée Origine (b)</b>	<b>-46,39</b>

## Limites de suivi

C	s	LS (+)	LS (-)
Ecart-type FI methode de référence (si différents)			
Niveau 1			
Niveau 2			
Niveau 3			

Regression linéaire

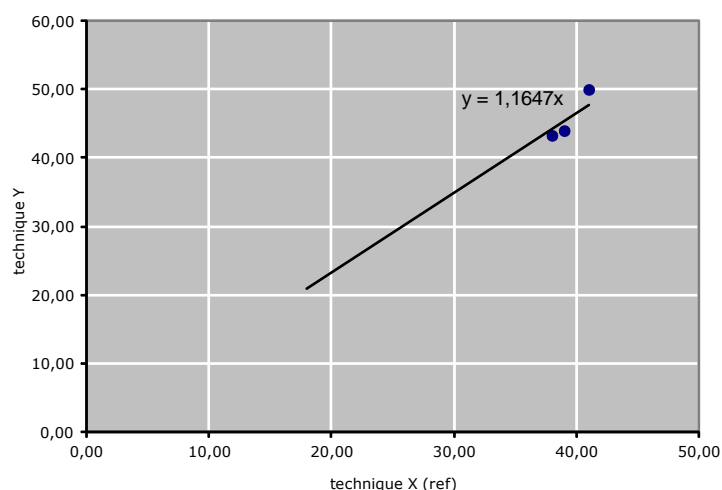


Diagramme des différences

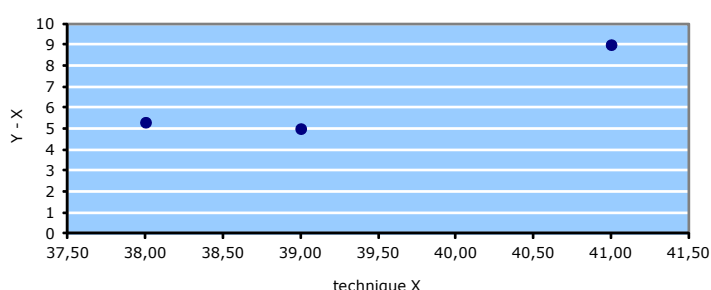
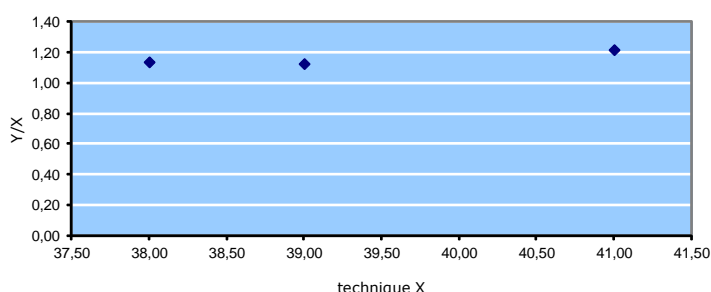


Diagramme des rapports





## Comparaison de techniques

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

HbH

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

Date	mars à novembre 2012
Technique X (ref)	D-10 Biorad (CLHP)
Technique Y	Minicap Sebia (EC)
Unité	%
Echantillon	
Commentaires	

### Résultats statistiques

	Technique X (ref)	Technique Y
Moyenne	13,5	14,7
Minimum	9,80	11,90
Maximum	17,20	17,40
Nb valeurs	2	2
	Différences Y - X	Différences relatives (%)
Moyenne	1,2	11,3

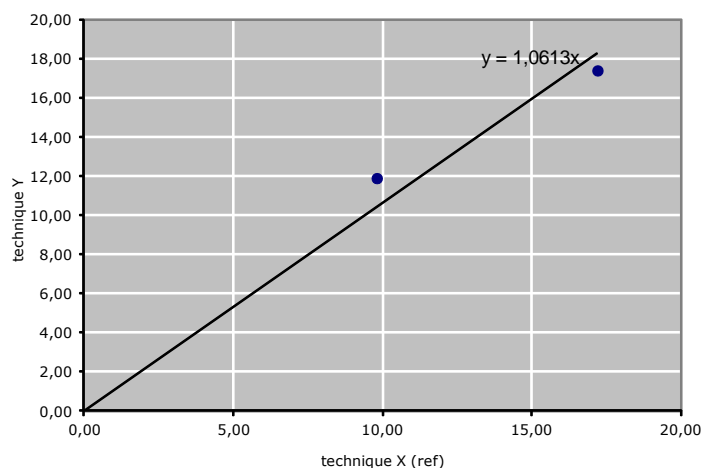
### Corrélation : $Y = aX + b$

Pente (a)	0,74
Ordonnée Origine (b)	4,62

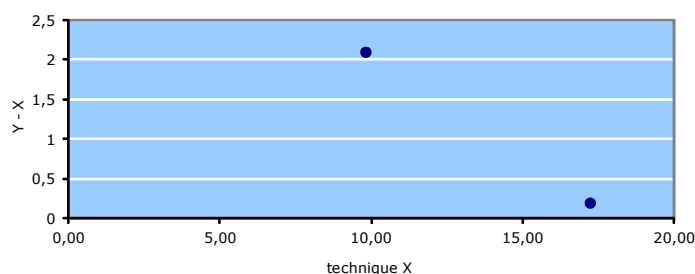
### Limites de suivi

C	s	LS (+)	LS (-)
Ecart-type FI méthode de référence (si différents)			
Niveau 1			
Niveau 2			
Niveau 3			

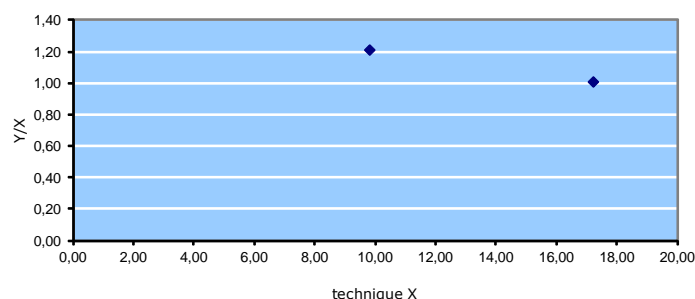
### Regression linéaire



### Diagramme des différences



### Diagramme des rapports



## Comparaison de techniques

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

Hb Constant Spring

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

Date	mars à novembre 2012
Technique X (ref)	D-10 Biorad (CLHP)
Technique Y	Minicap Sebia (EC)
Unité	%
Echantillon	
Commentaires	

### Résultats statistiques

	Technique X (ref)	Technique Y
Moyenne	3,2	3,6
Minimum	2,70	2,90
Maximum	3,70	4,20
Nb valeurs	2	2
	Différences Y - X	Différences relatives (%)
Moyenne	0,4	10,5

Corrélation :  $Y = aX + b$

Pente (a)	1,30
Ordonnée Origine (b)	-0,61

### Limites de suivi

C	s	LS (+)	LS (-)
Ecart-type FI méthode de référence (si différents)			
Niveau 1			
Niveau 2			
Niveau 3			

Regression linéaire

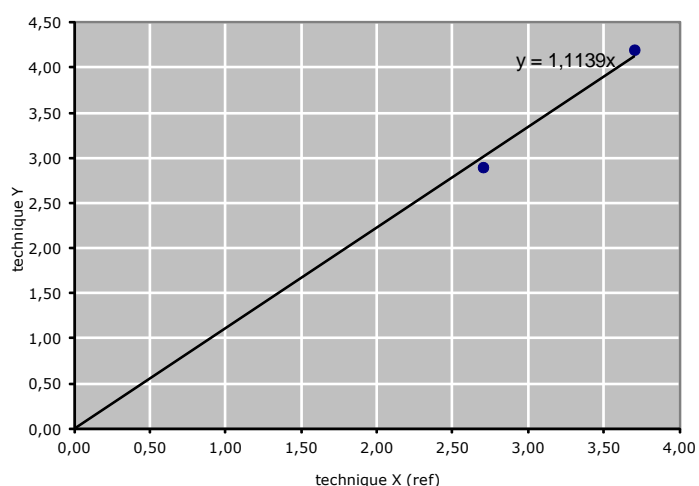


Diagramme des différences

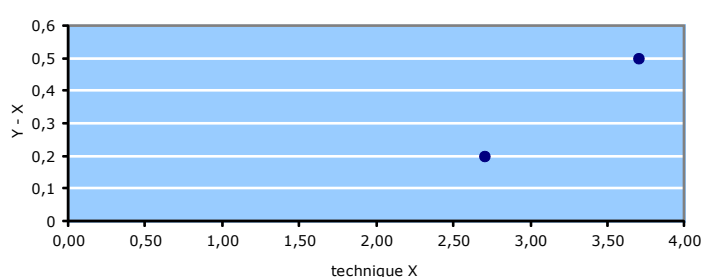
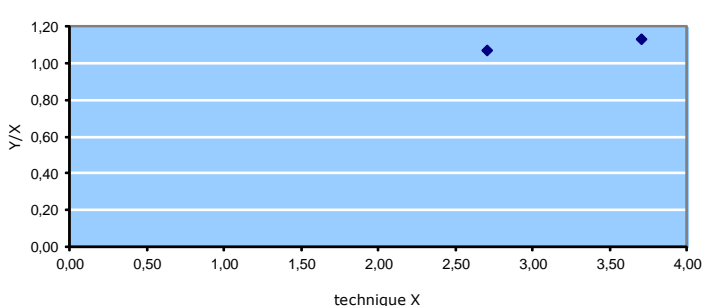


Diagramme des rapports



Les résultats obtenus sont très satisfaisants pour l'ensemble des hémoglobines étudiées (sachant tout de même qu'ils ne sont statistiquement pas significatifs pour certains variants en raison du faible nombre de valeurs), avec d'une part une très bonne corrélation, comme en témoignent les graphes de régression linéaire, et d'autre part une très bonne concordance, mise en évidence principalement par le diagramme des différences. En effet, pour chacun des diagrammes représentant  $Y - X$  en fonction de  $X$ , l'ensemble des points est très proche de zéro.

Cependant, alors que, pour l'Hb A2 et l'Hb F, ces points se situent de part et d'autre de la ligne horizontale représentant une différence nulle entre les deux méthodes, ils ont plutôt tendance à se situer au-dessus de cette ligne pour l'Hb S. Ceci témoigne d'une légère surestimation de l'Hb S par l'électrophorèse capillaire Minicap® Sebia par rapport à la CLHP D-10® BioRad. Les différences observées sont toutefois très faibles et non significatives, comme le confirme notamment le diagramme des rapports représentant  $Y / X$  en fonction de  $X$  pour lequel les valeurs restent toutes très proches de 1. Le même constat peut être fait pour l'Hb D. Bien que le nombre d'observations soit insuffisant pour en tirer des conclusions fiables, on remarque tout de même que pour les 3 échantillons étudiés, la valeur d'Hb D est toujours légèrement supérieure lorsqu'elle est déterminée par la technique d'électrophorèse capillaire par rapport à la technique de CLHP. Les rapports  $Y / X$  calculés pour ces 3 couples de valeurs sont néanmoins très proches de 1.

A l'inverse, les différences  $Y - X$  sont toutes négatives pour les 4 échantillons contenant de l'Hb E que nous avons étudiés. On peut donc en déduire que la valeur d'Hb E obtenue a tendance à être plus élevée par CLHP D-10® que par électrophorèse capillaire Minicap®, en tenant compte toutefois du faible nombre de points disponibles. De plus, il faut signaler qu'aucune valeur n'a pu être obtenue pour la quantification de l'Hb A2 par CLHP, celle-ci ne pouvant être séparée de l'Hb E, d'où une probable surestimation de l'Hb E par CLHP. Ainsi, il est logique de trouver les différences  $Y - X$  comme telles.

Les valeurs moyennes des différences  $Y - X$  et des différences relatives  $(Y - X) / X * 100$  pour chaque fraction de l'hémoglobine étudiée sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau XV) :

**Tableau XV. Résultats de la comparaison entre la technique X (D-10®) et la technique Y (Minicap®) pour chaque hémoglobine.**

Hémoglobine	Hb A2	Hb F	Hb S	Hb C	Hb E	Hb D	Hb H	Hb Cst spring
Moyenne des différences $Y - X$ ( % )	0,2	-0,4	3,6	0,0	-4,8	6,4	1,2	0,4
Moyenne des différences relatives ( % )	9,1	-20,5	10,4	0,6	-15,2	16,2	11,3	10,5

Plusieurs études de comparaison entre l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide de haute performance utilisées dans le cadre de la recherche d'anomalies de l'hémoglobine ont été publiées dans la littérature scientifique.

Parmi ces études figure celle de Keren *et al.* publiée en 2008 et ayant pour objet la comparaison du système d'électrophorèse capillaire Sebia Capillarys® avec la chromatographie liquide de haute performance Primus® dans l'évaluation des hémoglobinopathies (54). Il s'agit d'une étude prospective dans laquelle 297 échantillons destinés à la recherche d'hémoglobinopathies ont été analysés en double sur les deux systèmes. Contrairement à l'électrophorèse capillaire, la CLHP fournit un profil sur lequel sont séparées les différentes fractions post-traductionnelles des hémoglobines, incluant notamment les formes glyquées. En outre, les fractions de l'hémoglobine n'étant pas nécessairement séparées dans le même ordre par ces deux techniques, il est envisageable qu'un variant puisse avoir un impact sur un des deux tracés sans en avoir sur l'autre. Dans l'étude de Keren *et al.*, plusieurs groupes d'échantillons ont été constitués en fonction des variants d'hémoglobine contenus dans ces échantillons, ceci afin d'évaluer une éventuelle interférence d'un variant sur la quantification des autres fractions d'hémoglobine. Les résultats se rapportant aux divers groupes de profils étudiés figurent ci-après.

- Hb A, Hb A2 et Hb F dans 228 échantillons dépourvus d'Hb S (Tableau XVI) :

**Tableau XVI. Résultats obtenus par Keren *et al.* lors de l'étude de 228 échantillons dépourvus d'Hb S par électrophorèse capillaire Capillarys® et par CLHP Primus®.**

Hémoglobine	Electrophorèse capillaire		CLHP	
	Valeur moyenne (%)	Ecart-type (%)	Valeur moyenne (%)	Ecart-type (%)
Hb A	96,2	5,7	96,8	5,5
Hb A2	2,8	0,8	2,3	0,8
Hb F	0,9	5,6	0,9	5,4

Ainsi, les valeurs d'Hb A2 étaient systématiquement plus élevées par électrophorèse capillaire que par CLHP, quel que soit le niveau d'Hb A2. La régression linéaire représentant les résultats de la CLHP Primus® en fonction de ceux de l'électrophorèse capillaire Sebia a conduit à une droite dont la pente est de 0,931 et l'ordonnée à l'origine de -0,32.

- Hb S et Hb A2 dans 39 échantillons contenant de l'Hb S (Tableau XVII) :

**Tableau XVII. Résultats obtenus par Keren *et al.* lors de l'étude de 39 échantillons contenant de l'Hb S par électrophorèse capillaire Capillarys® et par CLHP Primus®.**

Hémoglobine	Electrophorèse capillaire		CLHP	
	Valeur moyenne (%)	Ecart-type (%)	Valeur moyenne (%)	Ecart-type (%)
Hb A2	3,1	0,8	4,0	1,0
Hb S	40,6	18,9	38,4	18,9

Les pourcentages d'Hb A2 étaient significativement plus élevés par CLHP que par électrophorèse capillaire. Ceci s'explique par la présence d'une fraction majeure des produits glyqués de l'Hb S migrant au même endroit que le pic d'Hb A2 sur le profil chromatographique. En présence d'Hb S, l'Hb A2 est donc surestimée par CLHP Primus®. Ce constat avait d'ailleurs déjà été fait par Suh *et al.* en 1996 dans une publication traitant de l'influence des adduits de l'Hb S sur la quantification de l'Hb A2 par CLHP BioRad Variant® (82). Puisqu'une augmentation de 1 % ou 2 % seulement peut être significative pour l'Hb A2, Keren *et al.* a mis en place un commentaire alertant de ce risque de surestimation de l'Hb A2 en présence d'Hb S sur les comptes-rendus de résultats.

Quant à l'Hb S, on constate que la valeur moyenne était légèrement plus élevée par électrophorèse capillaire que par CLHP. Là encore, cette différence peut s'expliquer par une migration différente des fractions glyquées de l'Hb S par CLHP, une partie de celles-ci migrant notamment dans le pic d'Hb A2.

- Hb C et Hb A2 dans 14 échantillons contenant de l'Hb C

Quatorze échantillons de patients présentant un trait Hb C ont été analysés par électrophorèse capillaire Capillarys® Sebia et par CLHP Primus®. Par CLHP, pour obtenir le pourcentage total d'Hb C, les pics correspondant aux produits de dégradation et aux formes glyquées de l'HbC ont été ajoutés au pic principal d'Hb C. Cependant, bien que dans une moindre mesure que pour l'Hb S, certains produits de dégradation de l'Hb C migrent dans le pic d'Hb A2 (Figure 18). Il s'est alors avéré nécessaire de signaler sur le compte-rendu de résultat une éventuelle surestimation de l'Hb A2. Par électrophorèse capillaire, les fractions glyquées ne sont pas séparées. En revanche, l'Hb C migrant dans une zone très proche de celle de l'Hb A2 (Figure 19), il arrive parfois que ces deux pics se chevauchent. Ceci a été constaté pour 2 des 14 échantillons analysés. Les auteurs précisent alors qu'ils ont indiqué dans leur compte-rendu que le pourcentage reflète l'Hb C et l'Hb A2.

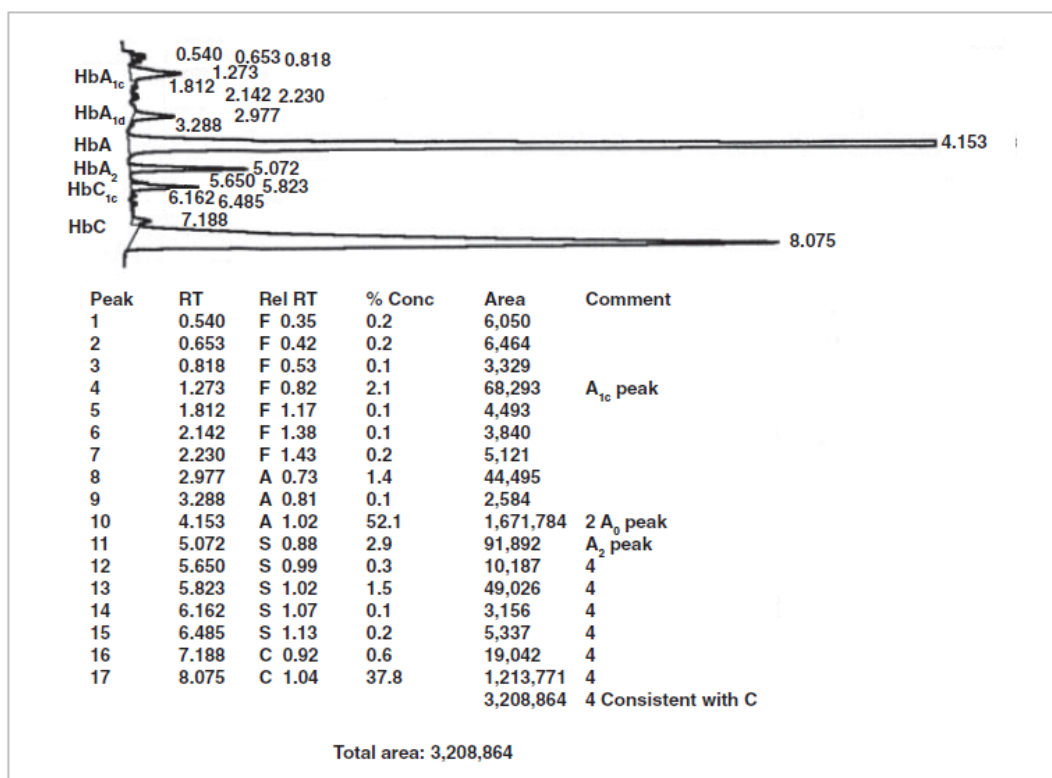


Figure 18. Profil obtenu par CLHP pour un échantillon de patient présentant un trait Hb C (54).

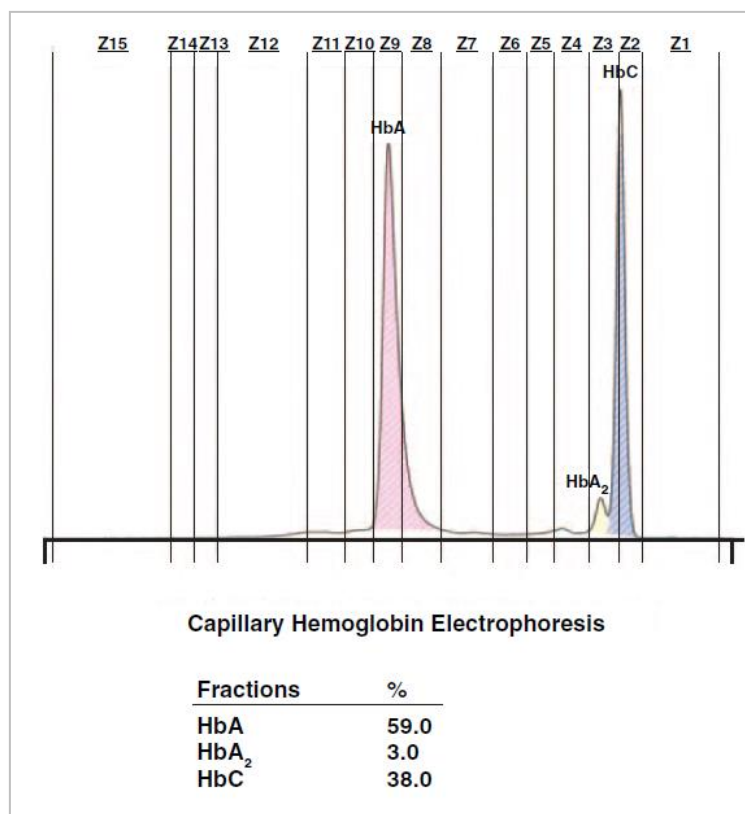


Figure 19. Profil obtenu par électrophorèse capillaire pour le même cas que dans la figure 18 (54).

- Analyse de variants de l'hémoglobine en l'absence d'Hb A

Un échantillon d'un patient hétérozygote SC a été étudié. Par CLHP, certains produits de dégradation et de glycation de l'Hb C migrent dans le pic d'Hb S, et d'autres, en moindre quantité, migrent dans le pic d'Hb A2. Ce dernier contient également certains produits de dégradation et de glycation de l'Hb S. Le pourcentage d'Hb A2 est donc largement susceptible d'être surestimé et cela doit être précisé dans le compte-rendu de résultat. Par électrophorèse capillaire, l'absence d'Hb A dans l'échantillon pose problème pour le positionnement des pics, le profil ne pouvant pas être centré sur l'Hb A en zone 9, et empêche donc l'identification des fractions contenues dans l'échantillon. Comme préconisé par le fournisseur, l'équipe de Keren a donc réalisé un mélange volume à volume de l'échantillon à analyser avec un échantillon de contrôle de qualité normal. L'analyse de ce mélange a permis l'identification des pics d'Hb S et d'Hb C, ceux-ci étant positionnés par rapport à l'Hb A présente dans le contrôle de qualité. En revanche, la quantification de ces pics reposait bien sûr sur les valeurs issues du premier passage de l'échantillon pur. De plus, il est à noter que l'Hb C et l'Hb A2 n'étaient pas suffisamment séparées et n'ont donc pas pu être quantifiées individuellement.

- Hb E et Hb A2 dans 3 échantillons contenant de l'Hb E

Alors que les profils électrophorétiques ont montré une séparation complète de l'Hb A2 et de l'Hb E pour les 3 échantillons étudiés, la CLHP n'a pas permis de quantifier l'Hb A2 et l'Hb E, ces deux hémoglobines co-éluent ensemble et sont donc retrouvées dans un pic unique. L'équipe de Keren a précisé dans les comptes-rendus de résultats que la valeur de l'Hb E incluait l'Hb A2. Dans les 3 cas étudiés, les valeurs d'Hb A2 étaient légèrement augmentées. Ceci est expliqué par le fait que l'Hb E constitue une forme structurale de  $\beta$ -thalassémie.

- Autres variants

En plus des 39 cas contenant de l'Hb S, 14 cas contenant de l'Hb C et 3 cas contenant de l'Hb E, d'autres variants plus rares ont été correctement identifiés par les deux méthodes : 2 cas contenant de l'Hb S et de l'Hb C, 2 cas avec un variant de l'Hb A2, 2 cas avec Hb D-Los Angeles (Punjab), 1 variant de l'Hb F, 1 cas avec Hb G-Philadelphia, 1 cas avec Hb S-G Philadelphia et 1 Hb Lepore. De plus, il est à noter que l'électrophorèse capillaire a permis la détection d'un cas contenant de l'Hb Athens/Waco alors que la CLHP ne l'avait pas détectée. Toutefois, en ayant recours à un temps d'élution plus long, la CLHP Primus<sup>®</sup> a finalement également détecté ce variant.

Dans une autre étude publiée en 2012, Greene *et al.* compare l'électrophorèse capillaire Sebia Capillarys Flex<sup>®</sup> avec la chromatographie liquide de haute performance BioRad Variant II<sup>®</sup> dans l'évaluation des hémoglobinopathies (39). Plusieurs types de profils ont été comparés :

- Hb A et Hb F dans des échantillons avec et sans variant de l'hémoglobine

Cent soixante-quatre échantillons ont été analysés par CLHP et par électrophorèse capillaire dans un délai de 24h maximum. Les résultats sont les suivants (Tableau XVIII) :

**Tableau XVIII. Résultats obtenus par Greene *et al.* lors de l'étude de 164 échantillons par électrophorèse capillaire Capillarys Flex<sup>®</sup> et par CLHP Variant II<sup>®</sup>.**

Hémoglobine	Electrophorèse capillaire		CLHP	
	Valeur moyenne (%)	Ecart-type (%)	Valeur moyenne (%)	Ecart-type (%)
Hb A	81,5	24,2	81,5	24,1
Hb F	1,7	5,3	1,9	4,3

Greene et son équipe ont montré une très bonne concordance entre les deux méthodes. Les valeurs élevées des écarts-types pour l'Hb A sont justifiées par l'utilisation d'échantillons ayant des concentrations très différentes en Hb A. Les régressions linéaires représentant les résultats de l'électrophorèse capillaire Sebia Capillarys Flex<sup>®</sup> en fonction de ceux de la CLHP BioRad Variant II<sup>®</sup> ont permis de conclure en une bonne corrélation entre ces deux méthodes : biais = - 0,06 et  $r = 0,999$  pour l'Hb A ; biais = -0,17 et  $r = 0,994$  pour l'Hb F. Toutefois, en excluant les échantillons présentant des valeurs élevées d'Hb F ( $> 3,4$  % par CLHP,  $> 3,2$  % par électrophorèse capillaire), les auteurs ont constaté une moindre concordance entre les deux méthodes (moyenne = 0,37 % par électrophorèse capillaire ; moyenne = 0,81 % par CLHP) avec un biais négatif plus important (biais = - 0,44 ;  $r = 0,811$ ).

- Hb A2 dans des échantillons avec et sans Hb C, Hb E et Hb S

En l'absence d'Hb S, Hb E et Hb C, les concentrations en Hb A2 étaient très concordantes entre Capillarys Flex<sup>®</sup> et BioRad Variant II<sup>®</sup> (biais = 0,00 ;  $r = 0,994$ ), avec une moyenne identique de 3,34 %. En revanche, Greene *et al.* a constaté une moins bonne concordance pour les échantillons contenant de l'Hb S, Hb C ou Hb E (biais = - 4,02 ;  $r = 0,0356$ ). Ces mauvais résultats sont expliqués d'une part par une quantification insuffisamment précise de l'Hb A2 en présence d'Hb S ou d'Hb E par CLHP en raison de la co-élution des fractions glyquées de l'Hb S et de l'Hb E avec l'Hb A2. D'autre part, l'Hb A2 ne peut pas être quantifiée précisément en présence d'Hb C par électrophorèse capillaire en raison du chevauchement de ces deux pics sur le profil électrophorétique.

A travers cette étude, l'équipe de Greene a également fait un constat intéressant : par rapport à la CLHP, l'électrophorèse capillaire présente un biais négatif pour les valeurs faibles d'Hb A2 ( $< 3,0$  % par CLHP ;  $< 3,1$  % par électrophorèse capillaire) et un biais positif pour les valeurs élevées d'Hb A2 ( $> 4,6$  % par CLHP ;  $> 4,7$  % par électrophorèse capillaire). Cela les amène à penser que l'électrophorèse capillaire puisse permettre une meilleure distinction entre les patients atteints de  $\beta$ -thalassémie et les patients ne présentant pas de  $\beta$ -thalassémie.



- Analyse de l'Hb S, Hb E et Hb C

Greene *et al.* a démontré une bonne concordance entre la CLHP et l'électrophorèse capillaire pour la quantification de l'Hb S (biais = 0,93 ;  $r = 0,996$ ), la comparaison ayant été réalisée sur 24 échantillons. De même, la comparaison de 9 échantillons contenant de l'Hb C a montré une bonne concordance entre les deux méthodes pour la quantification de l'Hb C (biais = - 0,81 ;  $r = 0,967$ ). En revanche, la CLHP n'a pas permis la détection de l'Hb E dans certains des échantillons, alors que l'électrophorèse capillaire l'a détectée dans les 27 échantillons analysés. Puisque l'Hb E co-élue avec l'Hb A2 par CLHP, on pourrait s'attendre à une bonne corrélation entre la concentration d'Hb A2 apparente (Hb A2 + Hb E) obtenue par CLHP et la somme des concentrations d'Hb E et d'Hb A2 obtenues par électrophorèse capillaire. Or, en effectuant cette comparaison, Greene et son équipe concluent en une corrélation peu satisfaisante (biais = 1,61 ;  $r = 0,934$ ).

- Analyse de l'Hb A2'

L'Hb A2' constitue le variant le plus fréquent de la chaîne  $\delta$ , particulièrement décrit dans la population afro-américaine. Les porteurs d'Hb A2' produisent deux petits pics de taille similaire correspondant à l'Hb A2 et à l'Hb A2'. Par CLHP, l'Hb A2' migre au même endroit que l'Hb S. Cependant, par électrophorèse capillaire, l'Hb A2' migre dans la zone 1 et ne pose pas de problème d'identification.

- Autres variants structurels identifiés

Les profils de 10 variants rares obtenus par CLHP et électrophorèse capillaire ont été comparés.

Ces deux méthodes ont permis une bonne identification des pics d'Hb Hasharon et d'Hb Q-India.

En revanche, l'Hb D et l'Hb G-Philadelphia éluent/migrent au même endroit par CLHP ainsi que par électrophorèse capillaire, ces deux techniques ne sont donc pas complémentaires dans ce cas de figure et ne permettent théoriquement pas l'identification de l'une ou l'autre hémoglobine. Cependant, l'Hb G-Philadelphia peut généralement être distinguée de l'Hb D par la présence d'un variant G2 (Figure 20).

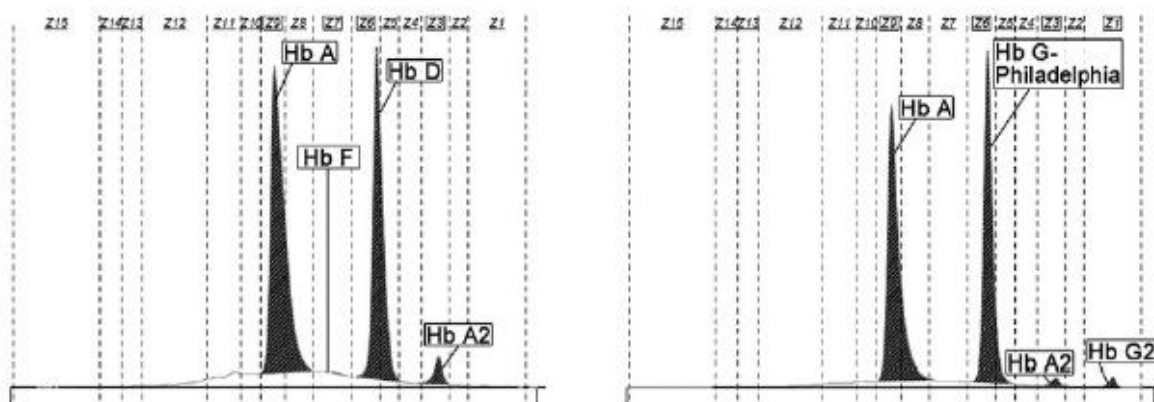
L'Hb SG-Philadelphia fournit un profil complexe dans les deux techniques, avec 3 fractions majeures correspondant aux Hb G-Philadelphia, Hb S et Hb SG-Philadelphia ainsi qu'un pic mineur G2. Alors que tous ces pics sont bien individualisés par CLHP, on observe un chevauchement des pics d'Hb G-Philadelphia et Hb S par électrophorèse capillaire.

L'Hb O-Arab et l'Hb Malamo forment deux pics distincts par CLHP alors que par électrophorèse capillaire, l'Hb O-Arab co-migre avec l'Hb A2 tandis que l'Hb Malamo co-migre avec l'Hb A.

A l'inverse, l'Hb N-Baltimore co-élue avec l'Hb A par CLHP, mais migre dans la zone 10 par électrophorèse capillaire, donc distincte des Hb A, Hb A2 et Hb F.

Enfin, l'Hb Bart's et l'Hb H éluent dans le volume mort par CLHP et ne sont par conséquent détectables qu'à des concentrations importantes ( $> 5\%$ ), sans pouvoir toutefois être quantifiées. Au contraire, l'électrophorèse capillaire permet la détection et la quantification de

ces variants même à des concentrations faibles de l'ordre de 1 %. De plus, par CLHP, la bilirubine peut éluier dans le volume mort et se confondre avec l'Hb Bart's ou l'Hb H alors qu'elle n'interfère pas par électrophorèse capillaire.



**Figure 20. Profils électrophorétiques obtenus par Capillarys Flex<sup>®</sup> pour un échantillon contenant de l'Hb D (à gauche) et pour un échantillon contenant de l'Hb G-Philadelphia (à droite) (39).**

Ces deux études viennent confirmer la nécessité de combiner au moins deux méthodes pour la recherche des anomalies de l'hémoglobine, l'une étant complémentaire de l'autre. L'interprétation concomitante des tracés électrophorétiques et chromatographiques permet de conclure plus précisément sur la présence ou non d'anomalies de l'hémoglobine, qu'elles soient qualitatives ou quantitatives.

De plus, les résultats de ces deux études corroborent nos propres résultats. En effet, les valeurs plus élevées d'Hb S que nous avons obtenues par électrophorèse capillaire par rapport à la CLHP (différence moyenne : 3,6 %) peuvent s'expliquer par le fait que la CLHP sépare les différentes fractions post-traductionnelles de l'Hb S et que certaines d'entre elles co-éluent notamment avec l'Hb A2, sous-estimant alors la proportion d'Hb S.

Concernant la quantification de l'Hb C, nous avons conclu en une bonne concordance (différence moyenne : 0,0 %) entre les deux méthodes, tout comme Greene *et al.* dans son étude. Keren *et al.* précise que le phénomène de co-élution des produits de dégradation de l'Hb C dans le pic d'Hb A2 par CLHP est bien moindre que pour l'Hb S. En revanche, alors que Keren *et al.* n'a pas pu obtenir de valeur pour la quantification de l'Hb A2 dans 2 des 14 échantillons analysés contenant de l'Hb C, en raison d'un chevauchement de ces deux pics, nous n'avons rencontré ce problème dans aucun des 3 échantillons que nous avons analysés. Les pics d'Hb C et d'Hb A2 ont en effet été correctement séparés dans chacun de ces 3 cas.

Quant à l'Hb E, nous avons montré que les valeurs obtenues par électrophorèse capillaire étaient systématiquement inférieures à celles obtenues par CLHP, avec une moyenne des différences de -4,8 %. Ceci s'explique par l'absence de séparation entre les pics d'Hb E et d'Hb A2 par CLHP, du fait de leur co-élution. Le pic obtenu par CLHP ne contient donc pas seulement l'Hb E mais à la fois l'Hb E et l'Hb A2, d'où une surestimation par

rapport à l'électrophorèse capillaire. Cependant, bien que l'hémoglobinoase E présente un caractère  $\beta$ -thalassémiant responsable d'une augmentation de la synthèse d'Hb A2, ceci ne semble pas suffisant pour expliquer une différence de 4,8 % entre les deux méthodes. En effet, l'Hb A2 est certes augmentée, mais sans atteindre toutefois des taux si importants, de l'ordre de 4,8 %. Ceci est en accord avec le constat émis par Greene *et al.* selon lequel la somme des concentrations d'Hb E et d'Hb A2 par électrophorèse capillaire est très peu corrélée avec la concentration correspondant au pic où co-élue l'Hb E et l'Hb A2 par CLHP. Cette différence observée reste sans explication.

Lors de notre étude, nous avons également démontré une bonne concordance entre l'électrophorèse capillaire et la CLHP pour la quantification de l'Hb A2 et de l'Hb F pour tous les échantillons analysés confondus. Cependant, en raison des interférences connues générées par certains variants sur la quantification de l'Hb A2 et du fait de l'importance de la précision de la quantification de l'Hb A2 pour une bonne interprétation des profils électrophorétiques ou chromatographiques, nous avons décidé de constituer plusieurs groupes d'échantillons en fonction des variants d'hémoglobine contenus dans ces échantillons et de comparer les deux méthodes pour la quantification de l'Hb A2 dans chacun de ces groupes. Ainsi, nous avons comparé les valeurs d'Hb A2 obtenues par électrophorèse capillaire et par CLHP au sein des groupes suivants :

- échantillons contenant de l'Hb S
- échantillons contenant de l'Hb C
- échantillons contenant de l'Hb D

Pour les échantillons contenant de l'Hb E, la CLHP ne permet pas de quantifier l'Hb A2 en raison de sa co-élution avec l'Hb E. Nous avons donc choisi de comparer la valeur donnée pour l'Hb E par CLHP, correspondant en théorie davantage à la somme de l'Hb E et de l'Hb A2, avec l'addition des deux concentrations d'Hb E et d'Hb A2 obtenues par électrophorèse capillaire.

Les résultats de ces comparaisons sont illustrés graphiquement ci-dessous :

## Comparaison de techniques

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

HbA2 en présence d'HbS

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

Date	mars à novembre 2012
Technique X (ref)	D-10 Biorad (CLHP)
Technique Y	Minicap Sebia (EC)
Unité	%
Echantillon	Echantillons contenant de l'Hb S
Commentaires	

### Résultats statistiques

	Technique X (ref)	Technique Y
Moyenne	2,8	3,0
Minimum	1,70	1,60
Maximum	5,50	5,10
Nb valeurs	63	63

	Différences Y - X	Différences relatives (%)
Moyenne	0,2	8,2

### Corrélation : $Y = aX + b$

Pente (a)	0,72
Ordonnée Origine (b)	0,99

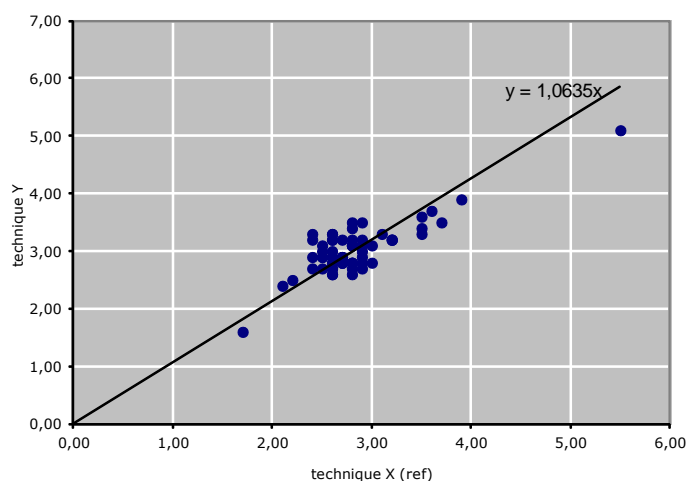
### Limites de suivi

C	s	LS (+)	LS (-)
2,88	0,19	0,736	-0,736
7,00	0,43	1,807	-1,807

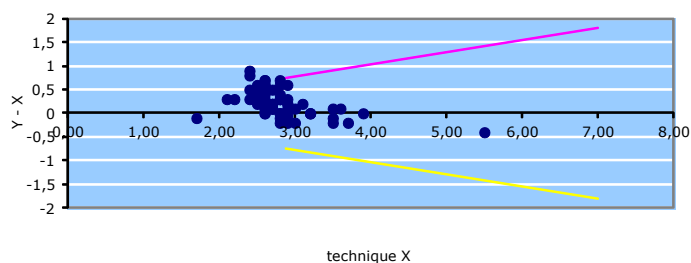
Ecart-type FI methode de référence (si différents)

Niveau 1	0,13
Niveau 2	0,15
Niveau 3	

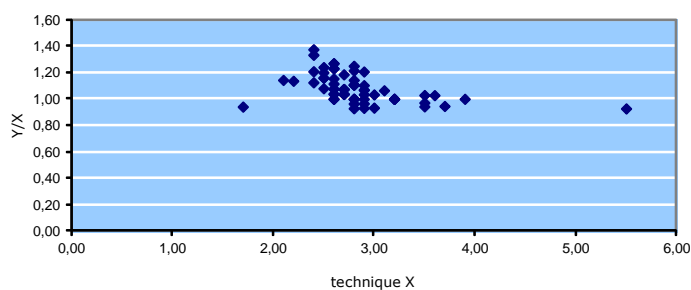
### Regression linéaire



### Diagramme des différences



### Diagramme des rapports



## Comparaison de techniques

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

HbA2 en présence d'HbC

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

Date	mars à novembre 2012
Technique X (ref)	D-10 Biorad (CLHP)
Technique Y	Minicap Sebia (EC)
Unité	%
Echantillon	Echantillons contenant de l'Hb C
Commentaires	

### Résultats statistiques

	Technique X (ref)	Technique Y
Moyenne	3,1	4,3
Minimum	2,90	3,60
Maximum	3,40	5,20
Nb valeurs	3	3

	Différences Y - X	Différences relatives (%)
Moyenne	1,2	38,4

### Corrélation : $Y = aX + b$

Pente (a)	-0,29
Ordonnée Origine (b)	5,15

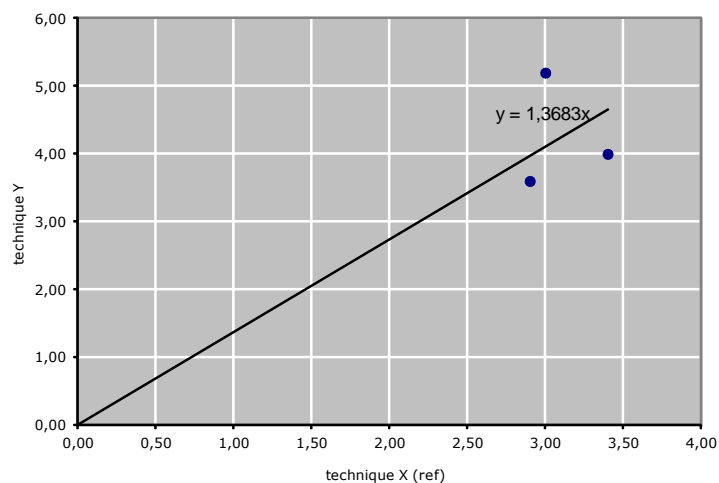
### Limites de suivi

C	s	LS (+)	LS (-)
2,88	0,19	0,736	-0,736
7,00	0,43	1,807	-1,807

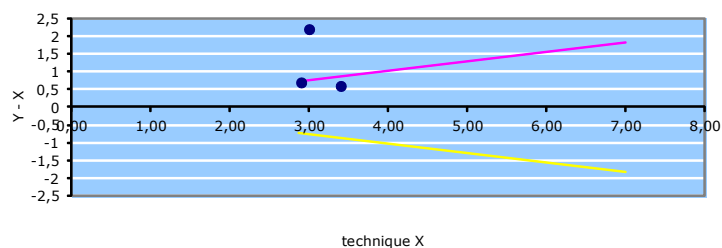
Ecart-type FI methode de référence (si différents)

Niveau 1	0,13
Niveau 2	0,15
Niveau 3	

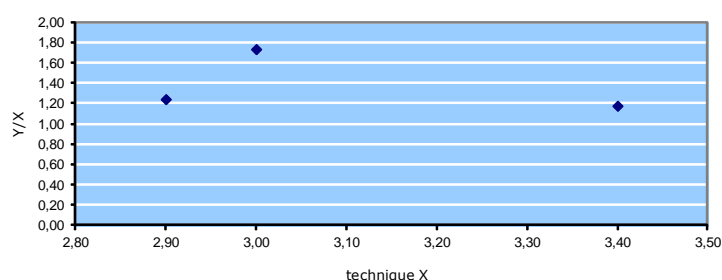
### Regression linéaire



### Diagramme des différences



### Diagramme des rapports



## Comparaison de techniques

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

HbA2 en présence d'HbD

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

Date	mars à novembre 2012
Technique X (ref)	D-10 Biorad (CLHP)
Technique Y	Minicap Sebia (EC)
Unité	%
Echantillon	Echantillons contenant de l'Hb D
Commentaires	

### Résultats statistiques

	Technique X (ref)	Technique Y
Moyenne	2,2	3,0
Minimum	1,90	2,70
Maximum	2,70	3,50
Nb valeurs	3	3
	Différences Y - X	Différences relatives (%)
Moyenne	0,7	33,4

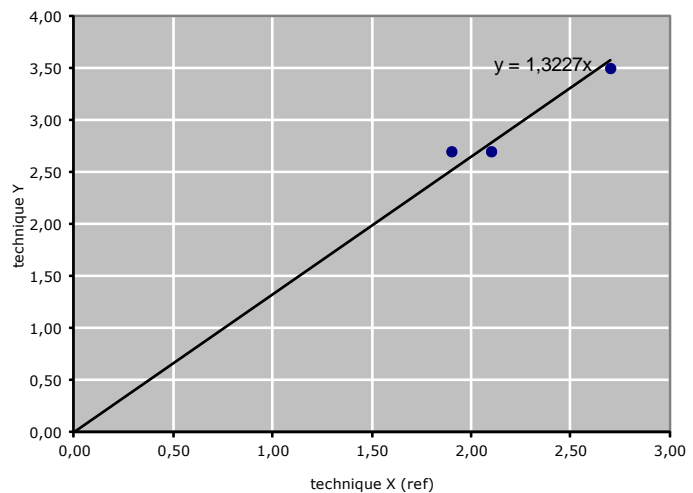
### Corrélation : $Y = aX + b$

Pente (a)	1,08
Ordonnée Origine (b)	0,56

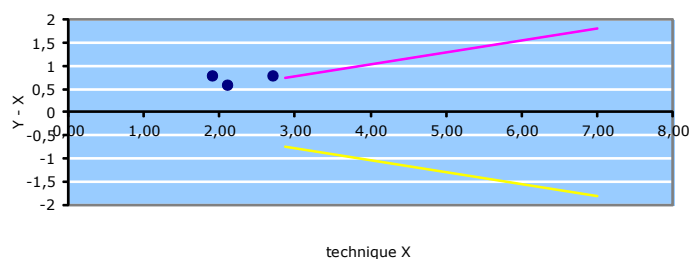
### Limites de suivi

C	s	LS (+)	LS (-)
2,88	0,19	0,736	-0,736
7,00	0,43	1,807	-1,807
Ecart-type FI méthode de référence (si différents)			
Niveau 1	0,13		
Niveau 2	0,15		
Niveau 3			

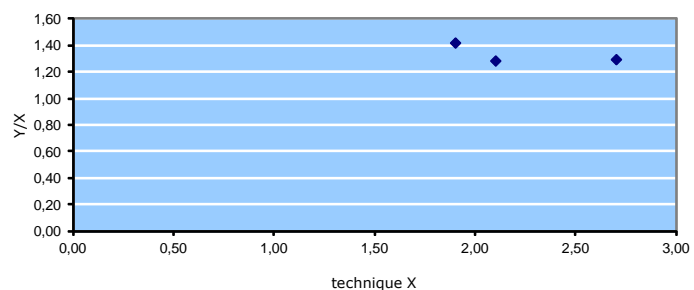
### Regression linéaire



### Diagramme des différences



### Diagramme des rapports



## Comparaison de techniques

**Structure**

SHB

**UF**

**Paramètre**

HbA2 + HbE

**Instrument**

Minicap Sebia

### Informations sur les conditions du test

Date	mars à novembre 2012
Technique X (ref)	D-10 Biorad (CLHP)
Technique Y	Minicap Sebia (EC)
Unité	%
Echantillon	Echantillons contenant de l'Hb E
Commentaires	

### Résultats statistiques

	Technique X (ref)	Technique Y
Moyenne	31,3	29,9
Minimum	29,00	28,40
Maximum	32,00	33,60
Nb valeurs	4	4

	Différences Y - X	Différences relatives (%)
Moyenne	-1,4	-4,3

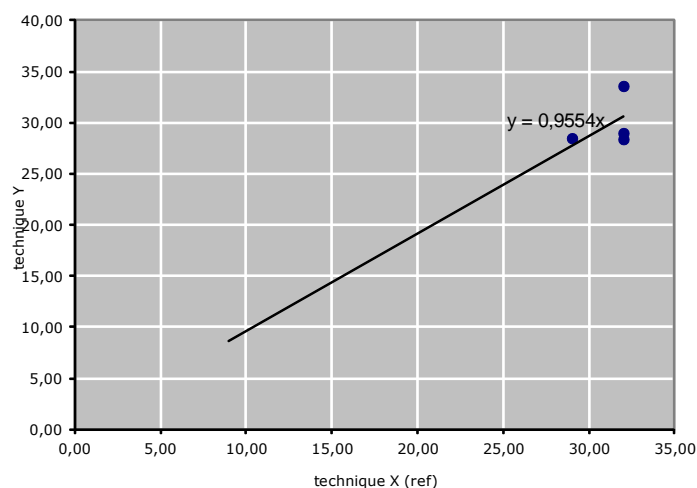
### Corrélation : $Y = aX + b$

Pente (a)	0,61
Ordonnée Origine (b)	10,78

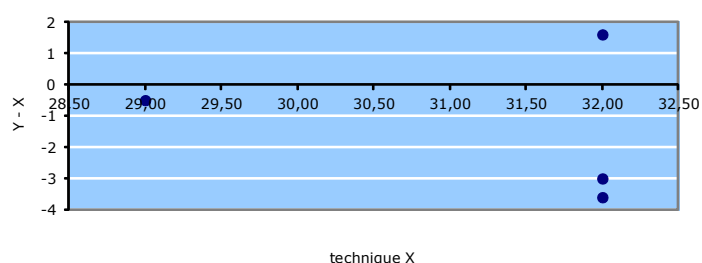
### Limites de suivi

C	s	LS (+)	LS (-)
Ecart-type FI méthode de référence (si différents)			
Niveau 1			
Niveau 2			
Niveau 3			

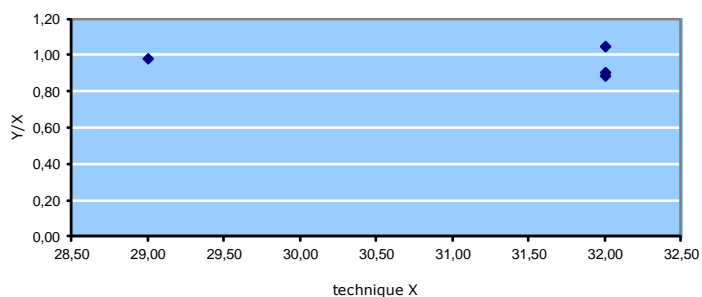
### Regression linéaire



### Diagramme des différences



### Diagramme des rapports



Les résultats comparatifs pour la concentration d'Hb A2 entre les différents groupes d'échantillons sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau XIX).

**Tableau XIX. Résultats par groupe d'échantillons de la comparaison entre l'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> et la CLHP D-10<sup>®</sup> pour la quantification de l'Hb A2.**

	Tous échantillons	Echantillons avec Hb S	Echantillons avec Hb C	Echantillons avec Hb E	Echantillons avec Hb D
Valeur moyenne de l'Hb A2 par CLHP (X) (%)	2,9	2,8	3,1	-	2,2
Valeur moyenne de l'Hb A2 par électrophorèse capillaire (Y) (%)	3,1	3,0	4,3	3,4	3,0
Moyenne des différences Y – X (%)	0,2	0,2	1,2	-	0,8

On constate que les valeurs moyennes d'Hb A2 dans les échantillons contenant de l'Hb S sont similaires à celles obtenues dans l'ensemble des échantillons analysés, par électrophorèse capillaire comme par CLHP. Ces deux méthodes présentent une bonne concordance, du même ordre de grandeur que pour l'ensemble des échantillons confondus. Ces résultats ne mettent donc pas en évidence un impact important des fractions post-traductionnelles de l'Hb S sur la quantification de l'Hb A2 par CLHP. Cependant, nous avons également fait remarquer que les valeurs d'Hb S étaient en moyenne supérieures de 3,6 % par électrophorèse capillaire par rapport à la CLHP, celle-ci séparant les différentes formes post-traductionnelles de l'Hb S. On peut donc supposer que seule une partie minime de ces fractions se retrouve dans le pic d'Hb A2, la majorité d'entre elles éluant probablement dans une zone distincte de celle de l'Hb A2.

Concernant les échantillons avec Hb C, le taux d'Hb A2 est en moyenne supérieur de 1,2 % par électrophorèse capillaire par rapport à la CLHP. Cette faible concordance entre les deux méthodes peut s'expliquer par une mauvaise séparation des pics d'Hb A2 et d'Hb C par Minicap<sup>®</sup>, ce phénomène étant connu pour les méthodes d'électrophorèse capillaire. Bien que les pics soient correctement identifiés par Minicap<sup>®</sup> pour chacun des 3 échantillons analysés, il est possible qu'un léger chevauchement des pics à leurs bases soit responsable de cette surestimation de l'Hb A2, dont la valeur moyenne est de 4,3 %. Cependant, il paraît alors étonnant de ne pas retrouver cette interférence sur la quantification de l'Hb C, pour laquelle nous avons mis en évidence une excellente concordance entre les deux méthodes. Mais, les valeurs d'Hb C (moyenne = 34,3 %) étant plus élevées que celles de l'Hb A2, on peut s'attendre à ce que l'interférence soit bien plus marquée pour l'Hb A2 que pour l'Hb C.



Dans le cas des échantillons contenant de l'Hb E, s'il est impossible de réaliser une comparaison entre électrophorèse capillaire et CLHP pour la quantification de l'Hb A2 puisque la CLHP ne permet pas la séparation des Hb E et Hb A2, on peut tout de même constater que la concentration moyenne d'Hb A2 (3,4 %) par électrophorèse capillaire est légèrement supérieure aux valeurs de référence (2,2 – 3,2 %). Ceci est à rapprocher du syndrome thalassémique qui accompagne les hémoglobinoses E. En revanche, la comparaison entre la somme des Hb E et Hb A2 obtenues par Minicap® et la concentration apparente d'Hb E obtenue par D-10®, correspondant probablement à une association d'Hb E et d'Hb A2, montre une moyenne des différences à -1,4 %, avec une moyenne des différences relatives de -4,3 %. Ces résultats affichent donc une concordance qui semblerait acceptable entre les deux méthodes pour les paramètres Hb E et Hb A2 associés, contrairement aux conclusions de Greene *et al.* qui mettaient en avant une faible concordance, avec un biais positif pour l'électrophorèse capillaire par rapport à la CLHP. Toutefois, la CLHP ne pouvant pas donner de valeurs individualisées pour les concentrations d'Hb E et d'Hb A2, la concentration apparente d'Hb E donnée par cette méthode ne peut pas être rendue, tout du moins sans un commentaire mentionnant une probable surestimation de cette valeur d'Hb E en raison de la co-élution de l'Hb A2. En présence d'Hb E, il est alors préférable de rendre compte des valeurs obtenues par électrophorèse capillaire.

Enfin, concernant les trois échantillons contenant de l'Hb D analysés, les résultats montrent une valeur moyenne d'Hb A2 légèrement supérieure par électrophorèse capillaire (3,0 %) par rapport à la CLHP (2,2 %). Cette différence pourrait s'expliquer par une mauvaise intégration du pic d'Hb A2 par CLHP, comme cela a déjà pu être constaté par Higgins *et al.* pour des échantillons contenant un sous-variant de l'Hb D : l'Hb D-Punjab.

En effet, dans une étude publiée en 2009, Higgins *et al.* compare l'électrophorèse capillaire Capillarys 2® (Sebia) avec la chromatographie liquide de haute performance Variant II® (BioRad) pour la quantification de l'Hb A2 chez des patients avec et sans  $\beta$ -thalassémie et en présence d'Hb S, Hb C, Hb E et Hb D-Punjab (49). Les résultats sont les suivants :

- Hb A2 en présence d'Hb D-Punjab

L'analyse de 27 échantillons de patients présentant une Hb D-Punjab hétérozygote a montré une différence moyenne de - 1,29 % entre la CLHP et l'électrophorèse capillaire (valeur moyenne de l'Hb A2 : 1,5 % par Variant II® ; 2,8 % par Capillarys®). Ces valeurs d'Hb A2 plus élevées par électrophorèse capillaire que par CLHP sont venues confirmer l'hypothèse déjà émise par Dash (33) et par Cotton *et al.* (29) selon laquelle la diminution de l'Hb A2 est due à une erreur d'intégration sur la ligne de base par CLHP et non à une réelle diminution de l'Hb A2 chez des patients présentant un trait Hb D-Punjab.

Par ailleurs, les résultats concernant les autres groupes d'échantillons et leur interprétation sont également intéressants :

- Hb A2 chez des patients avec et sans trait  $\beta$ -thalassémique

Alors que Keren *et al.* concluait que la valeur moyenne d'Hb A2 était plus élevée par électrophorèse capillaire que par CLHP (54) et Greene *et al.* démontrait une parfaite concordance entre ces deux méthodes pour la quantification de l'Hb A2 (39), l'équipe de Higgins a conclu que les concentrations d'Hb A2 chez des patients avec et sans trait  $\beta$ -thalassémique étaient plus basses sur le système Capillarys 2<sup>®</sup> (Sebia) que sur le Variant II<sup>®</sup> (BioRad). Cotton *et al.* avait également conclu en 2009 que les concentrations d'Hb A2 obtenues par électrophorèse capillaire présentaient un biais négatif systématique par rapport à celles obtenues par CLHP (31).

Cependant, Higgins *et al.* fait remarquer que les valeurs de référence de l'Hb A2 sont plus basses pour le système Capillarys 2<sup>®</sup> que pour le système Variant II<sup>®</sup>, ceci reflétant les valeurs plus basses d'Hb A2 obtenues par électrophorèse capillaire. Il conclut finalement en une bonne corrélation entre les deux méthodes, en accord avec les travaux de Mario *et al.* publiés précédemment (68). Il rappelle également que, bien qu'un groupe de travail de l'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) soit dédié à la standardisation de l'Hb A2, il n'existe à l'heure actuelle toujours pas de méthode de référence pour la quantification de l'Hb A2, ni de matériel de calibration de référence.

- Hb A2 en présence d'Hb S

Les résultats montrent une valeur moyenne d'Hb A2 constamment plus faible par Capillarys 2<sup>®</sup> que par Variant II<sup>®</sup>, que ce soit pour des patients drépanocytaires hétérozygotes ou homozygotes. En outre, Higgins *et al.* a constaté que l'augmentation des concentrations moyennes d'Hb A2 (Variant II<sup>®</sup> : 2,95 % vs 3,81 % ; Capillarys 2<sup>®</sup> : 2,49 % vs 3,06 %) entre les échantillons dépourvus d'Hb S et ceux contenant de l'Hb S était plus importante pour la CLHP que pour l'électrophorèse capillaire. Ceci l'a amené à conclure que l'interférence des adduits de l'Hb S sur l'Hb A2 était plus importante pour la CLHP que pour l'électrophorèse capillaire, mais, bien que plus faible, tout de même présente aussi pour cette dernière.

- Hb A2 en présence d'Hb E

Higgins *et al.* a à son tour confirmé l'impossibilité de quantifier l'Hb E par CLHP en raison de sa co-élution avec l'Hb A2. Alors que la concentration moyenne de l'Hb E par Capillarys 2<sup>®</sup> était de 23,91 %, elle était de 30 % sur le système Variant II<sup>®</sup>. Higgins et son équipe ont également constaté que la valeur moyenne de l'Hb A2 (3,65 %) obtenue par Capillarys 2<sup>®</sup> chez des patients présentant un trait Hb E était plus élevée que celle calculée dans la population de patients sans trait  $\beta$ -thalassémique. Ceci s'explique par une synthèse diminuée de la chaîne  $\beta$ -globine anormale, conduisant à une augmentation de la liaison des chaînes  $\alpha$  en excès avec les chaînes  $\delta$ .

Ces conclusions sont tout à fait identiques à celles apportées par une autre étude publiée en 2009 par Mais *et al.* (66) portant sur la valeur de l'Hb A2 déterminée par électrophorèse capillaire Sebia Capillarys<sup>®</sup> chez des patients présentant une Hb E hétérozygote.

- Hb A2 en présence d'Hb C

Alors que l'électrophorèse capillaire a montré sa supériorité par rapport à la CLHP pour la quantification de l'Hb A2 en présence d'Hb D-Punjab ou d'Hb E, c'est au contraire la CLHP qui s'avère meilleure pour la quantification de l'Hb A2 en présence d'Hb C en raison d'une mauvaise séparation de l'Hb A2 et de l'Hb C par électrophorèse capillaire. L'étude de Higgins *et al.* confirme donc bien les observations réalisées dans d'autres études.

Le tableau ci-dessous (Tableau XX), au vu des résultats de notre étude et de ceux rapportés dans la littérature scientifique, constitue un résumé concernant la méthode de quantification de l'Hb A2 la plus adaptée en fonction de la présence d'un éventuel variant de l'hémoglobine.

**Tableau XX. Technique (CLHP ou électrophorèse capillaire) la plus adaptée pour la quantification de l'Hb A2 selon le type de profil.**

Variant présent dans l'échantillon	Absence de variant	Hb S	Hb C	Hb E	Hb D
Technique la plus adaptée	CLHP / EC	EC	CLHP	EC	EC

En 2012, Paleari *et al.* a publié une étude comparant plusieurs méthodes de CLHP et d'électrophorèse capillaire pour l'évaluation de l'Hb A2 (75).

Cinq méthodes de CLHP, parmi lesquelles figurent BioRad Variant I<sup>®</sup> et BioRad Variant II<sup>®</sup>, ainsi que trois méthodes d'électrophorèse capillaire, dont Sebia Capillarys II<sup>®</sup>, ont été comparées. Les résultats ont montré une bonne corrélation entre les différentes méthodes mais un biais proportionnel significatif a systématiquement été mis en évidence. Ces discordances de quantification de l'Hb A2 entre les différentes méthodes n'ont pas surpris Paleari *et al.* en raison de l'absence de système de référence dédié et de matériel de calibration commun.

Il précise que la faible augmentation du taux d'Hb A2 observée par CLHP chez des patients présentant un trait Hb S a déjà bien été documentée et correspond à la co-élution de l'Hb A2 avec les adduits de l'Hb S. Cependant, par électrophorèse capillaire, les valeurs moyennes d'Hb A2 obtenues chez des patients porteurs d'Hb S sont également plus élevées que celles obtenues dans la population contrôle. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer cette élévation de l'Hb A2 : s'agit-il d'un artefact technique ou est-ce la conséquence d'une plus grande affinité des chaînes  $\alpha$  pour les chaînes normales  $\delta$  par rapport aux chaînes mutées  $\beta^S$  ? Ce point reste encore à clarifier.

Enfin, lors de notre étude, deux échantillons contenant de l'Hb H et de l'Hb Constant Spring ont été analysés. Concernant l'Hb H, les résultats ont montré une concentration moyenne supérieure de 1,2 % par électrophorèse capillaire par rapport à la CLHP. Par électrophorèse capillaire, l'Hb H migre dans la zone 15, c'est-à-dire en position la plus anodique. Par CLHP, l'Hb H élue dans la première partie du chromatogramme, bien avant le pic d'Hb F, et peut se situer avant le point d'intégration (80). Une mauvaise intégration du pic d'Hb H pourrait donc expliquer la valeur moyenne plus faible obtenue par CLHP, l'électrophorèse capillaire se montrant alors supérieure pour la quantification de l'Hb H.

Pour l'Hb Constant Spring, nous avons obtenu des concentrations très proches par Minicap<sup>®</sup> et D-10<sup>®</sup>, avec toutefois des valeurs légèrement supérieures par électrophorèse capillaire par rapport à la CLHP (différence moyenne = 0,4 %).

Waneesorn *et al.* a établi des conclusions similaires dans un article publié en 2011 dans lequel il compare l'électrophorèse capillaire (Capillarys 2<sup>®</sup>, Sebia) et la CLHP (Variant  $\beta$ -Thalassémie Short Program<sup>®</sup>, BioRad) pour la quantification de l'Hb Constant Spring (CS) (88). Cette hémoglobine anormale, de prévalence élevée en Asie du Sud, résulte d'une mutation au niveau du gène codant pour l' $\alpha 2$ -globine. Les sujets hétérozygotes pour l'Hb CS sont cliniquement et hématologiquement normaux. En revanche, les sujets homozygotes présentent une anémie hémolytique modérée, s'accompagnant d'ictère et hépatosplénomégalie. En outre, l'association d'une Hb CS avec une  $\alpha 1$ -thalassémie, de génotype (-/- $\alpha^{CS}\alpha$ ), conduit à des manifestations cliniques semblables à celles observées dans les  $\beta$ -thalassémies majeures.

En raison de l'instabilité de son ARNm, l'Hb CS est présente en faible concentration dans le sang périphérique. De ce fait, l'Hb CS est souvent non détectée par les méthodes analytiques de routine.

Waneesorn *et al.* a analysé les profils chromatographiques et électrophorétiques de 19 sujets hétérozygotes et 14 sujets homozygotes pour l'Hb CS, ainsi que de 10 sujets présentant une hémoglobinoase H-CS (Hb CS associée à une  $\alpha 1$ -thalassémie), comme pour nos deux échantillons analysés. Par électrophorèse capillaire, l'Hb CS, migrant en zone 2, a été détectée dans tous les échantillons alors que par CLHP, le pic d'Hb CS a été mis en évidence dans 26,32 % des échantillons avec Hb CS hétérozygote, 42,86 % des échantillons avec Hb CS homozygote et 90 % des échantillons Hb H-CS.

De plus, pour chacun de ces trois groupes, les taux d'Hb CS étaient significativement plus élevés par électrophorèse capillaire que par CLHP, les valeurs moyennes les plus basses étant trouvées chez les patients hétérozygotes CS tandis que les valeurs moyennes les plus hautes étaient observées chez les patients présentant une maladie Hb H-CS.

Les résultats concernant la concentration d'Hb CS dans chaque groupe et selon chaque méthode sont représentés dans le tableau suivant (Tableau XXI) :

**Tableau XXI. Résultats obtenus par Waneesorn *et al.* lors de l'étude de comparaison entre l'électrophorèse capillaire Capillarys 2<sup>®</sup> et la CLHP Variant  $\beta$ -Thalassémie Short Program<sup>®</sup> pour la quantification de l'Hb CS.**

	Hb CS (%)	
	Electrophorèse capillaire	CLHP
Hétérozygotes Hb CS (n = 19)	0,4 $\pm$ 0,2 (0,1 – 0,8)	0,1 $\pm$ 0,3 (0,0 – 1,2)
Homozygotes Hb CS (n = 14)	1,7 $\pm$ 1,7 (0,2 – 4,6)	0,6 $\pm$ 1,0 (0,0 – 3,7)
Maladie Hb H-CS (n = 10)	3,0 $\pm$ 1,0 (2,0 – 5,0)	1,0 $\pm$ 0,7 (0,0 – 2,7)

Par conséquent, l'électrophorèse capillaire s'est montrée supérieure à la fois pour la détection et la quantification de l'Hb CS. Cette méthode, permettant la quantification de faibles concentrations d'Hb CS (jusque 0,1 %), est particulièrement recommandée pour le dépistage des traits Hb CS.

En conclusion, les résultats de la comparaison entre la méthode d'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> (Sebia) et la méthode de CLHP D-10<sup>®</sup> (BioRad) ont montré une corrélation et une concordance satisfaisantes entre ces deux méthodes pour les fractions d'hémoglobine les plus fréquemment rencontrées en clinique. De plus, ces résultats ont en partie illustré l'intérêt de recourir à plusieurs techniques complémentaires pour la recherche d'hémoglobines anormales. Ainsi, alors que la CLHP présente une performance supérieure par rapport à l'électrophorèse capillaire pour la quantification de l'Hb A2 en présence d'Hb C, l'électrophorèse capillaire s'est montrée supérieure pour les échantillons contenant de l'Hb S, de l'Hb E ou encore de l'Hb D. Les conclusions de notre comparaison de méthodes se sont montrées concordantes avec les résultats d'un grand nombre d'études déjà publiées dans la littérature scientifique.

### III.3.2. Avantages et inconvénients de chacune des deux méthodes

La CLHP présente l'avantage de recourir à des échantillons de sang total et de nécessiter de petits volumes pour l'analyse, contrairement à l'électrophorèse capillaire qui nécessite la préparation de culots globulaires, le volume minimal de culot pouvant être analysé étant de 150  $\mu$ L. L'inconvénient en est double : en plus de nécessiter un volume d'échantillon plus important, ce qui peut éventuellement poser problème pour des prélèvements pédiatriques difficiles notamment, cela oblige le technicien de laboratoire à réaliser une étape pré-analytique supplémentaire. Cette étape prend du temps et augmente le risque d'erreur d'identification des prélèvements. Toutefois, l'acquisition d'un système de perçage des bouchons avec agitation des tubes (Flex Piercing) sur Minicap<sup>®</sup> permettrait de s'affranchir de cette contrainte. Ce dispositif n'a pas pu être installé initialement pour des raisons de coûts, mais pourrait être envisagé par la suite.

En revanche, l'électrophorèse capillaire présente l'avantage de fournir un profil électrophorétique facilement interprétable. En effet, les chromatogrammes obtenus sur D-10<sup>®</sup> BioRad sont constitués par un nombre de pics plus importants, correspondant aux différentes formes de glycation des hémoglobines. L'interprétation des chromatogrammes est donc plus délicate et nécessite davantage d'expérimentation.

De plus, la séparation des différentes formes de glycation des hémoglobines augmente le risque d'erreur d'identification et de quantification des pics par chevauchement de différentes fractions entre elles. En effet, comme nous l'avons déjà démontré, par CLHP certaines fractions glyquées des variants de l'hémoglobine, telles les Hb S et Hb E, co-éluent avec l'Hb A2. Ceci conduit à une quantification imprécise des différentes fractions, avec un impact plus important pour l'Hb A2 dont la concentration est faible et la quantification déterminante pour l'interprétation des profils.

Cependant, il existe aussi un risque de chevauchement des pics par électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup>. C'est notamment le cas de l'Hb C qui co-migre avec l'Hb A2, leur séparation étant parfois impossible. Dans de telles situations, l'avantage revient alors à la CLHP D-10<sup>®</sup>, d'autant que l'interférence des fractions glyquées de l'Hb C sur la quantification de l'Hb A2 est relativement faible.

En outre, un autre inconvénient de l'électrophorèse capillaire est l'absence de positionnement correct des pics dans les échantillons dépourvus d'Hb A, obligeant alors à répéter l'analyse en réalisant un mélange de l'échantillon patient avec un échantillon contenant de l'Hb A (contrôle interne de qualité ou autre échantillon patient connu contenant de l'Hb A). Cette étape supplémentaire demande donc un peu plus de temps pour l'obtention du profil électrophorétique.

Mais globalement, en termes de durée d'analyse et de coût, les deux méthodes sont similaires et aucune ne présente un avantage significatif par rapport à l'autre.

### III.3.3. Choix de la méthode pour le rendu quantitatif des fractions de l'hémoglobine

L'étude de comparaison ayant montré une bonne concordance et une bonne corrélation entre l'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> et la CLHP D-10<sup>®</sup>, il semble difficile de choisir une de ces deux méthodes plutôt que l'autre pour le rendu quantitatif des fractions de l'hémoglobine, notamment dans le cas de profils ne mettant pas en évidence d'anomalies qualitatives de l'hémoglobine et présentant donc uniquement des fractions d'Hb A, d'Hb A2 et éventuellement d'Hb F. Il semble alors légitime de rendre au clinicien les valeurs obtenues par les deux méthodes.

En revanche, puisque nos résultats ont permis de conclure en une plus grande efficacité de l'électrophorèse capillaire pour les échantillons contenant notamment de l'Hb S, Hb E, Hb

D, Hb H et Hb Constant Spring, on pourrait envisager de ne rendre que les valeurs obtenues par Minicap<sup>®</sup> pour ces échantillons. A l'inverse, la CLHP serait retenue pour le rendu quantitatif des différentes fractions de l'hémoglobine dans les échantillons contenant de l'Hb C. Il peut également être envisagé de rendre les quantifications des différentes fractions obtenues par chacune des deux méthodes, en prenant soin d'intégrer, sur les comptes-rendus de résultats, des commentaires expliquant les éventuelles interférences présentes et leur impact sur la quantification de chacune des fractions.

## CONCLUSION

Suite à l'actualisation des recommandations concernant l'étude de l'hémoglobine par le réseau DHOS « Pathologie héréditaire de l'érythrocyte » en 2010, le système d'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup>, commercialisé par Sebia, a été mis en place au laboratoire d'Hématologie du CHU de Nancy pour la recherche des anomalies de l'hémoglobine. Ces nouvelles recommandations placent en effet désormais l'électrophorèse capillaire en première ligne, au même titre que la CLHP par échange de cations.

La nouvelle stratégie de recherche d'une anomalie de l'hémoglobine au CHU de Nancy fait dorénavant intervenir la CLHP (D-10<sup>®</sup>, Bio-Rad) et l'électrophorèse capillaire (Minicap<sup>®</sup>, Sebia) en première intention, cette dernière remplaçant l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin. En cas de difficulté d'interprétation, l'électrophorèse sur gel d'agarose à pH acide continue d'être réalisée en deuxième intention. Le test d'Itano peut également s'avérer utile pour confirmer la présence d'Hb S.

Lors de la vérification de méthode sur site, en portée flexible standard A, nous avons montré que les performances du système Minicap<sup>®</sup> étaient satisfaisantes pour l'ensemble des paramètres évalués et conformes aux spécifications retenues. L'étude de corrélation de l'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup>, technique quantitative, avec l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin, technique qualitative utilisée auparavant, s'est également montrée satisfaisante. En effet, pour chaque échantillon analysé, les deux méthodes ont permis une identification équivalente des différentes fractions de l'hémoglobine, l'électrophorèse capillaire étant en l'occurrence supérieure en termes de sensibilité, spécificité et résolution. En plus de permettre une quantification précise et fiable des fractions de l'hémoglobine, l'électrophorèse capillaire automatisée présente également l'avantage de diminuer les durées d'analyses et les risques d'erreurs. L'ensemble de ces arguments a donc contribué au remplacement de l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin par l'électrophorèse capillaire.

Enfin, l'électrophorèse capillaire Minicap<sup>®</sup> et la CLHP D-10<sup>®</sup>, méthode déjà utilisée au LBM, étant réalisées conjointement lors de la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine, nous avons comparé ces deux méthodes pour l'identification et la quantification des principales fractions de l'hémoglobine rencontrées en situation clinique. Parmi les échantillons analysés au SHB du CHU de Nancy durant la période d'étude, soixante-dix sept d'entre eux contenaient de l'Hb S, trois de l'Hb C, quatre de l'Hb E, trois de l'Hb D, deux de l'Hb H et de l'Hb Constant Spring. Les résultats de l'étude de comparaison ont montré une concordance et une corrélation satisfaisantes entre les deux méthodes, avec toutefois une réserve pour les variants présents en nombre insuffisant pour que les résultats soient statistiquement significatifs. En outre, nous avons montré l'intérêt d'utiliser en première ligne ces deux méthodes quantitatives lors de l'étude de l'hémoglobine, celles-ci étant complémentaires. En effet, alors que la CLHP présente une performance supérieure par



rapport à l'électrophorèse capillaire pour la quantification de l'Hb A2 en présence d'Hb C, l'électrophorèse capillaire s'est montrée supérieure pour les échantillons contenant de l'Hb S, de l'Hb E ou encore de l'Hb D, en accord avec les données de la littérature scientifique.

La nouvelle stratégie adoptée au CHU de Nancy pour la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine nous semble donc parfaitement adaptée au diagnostic des principales hémoglobinopathies, en particulier les syndromes drépanocytaires majeurs qui nécessitent un diagnostic en urgence (Hb S à l'état homozygote ou en association avec une Hb C, Hb E, Hb D-Punjab, Hb O-Arab ou avec une  $\beta$ -thalassémie). En revanche, en cas de suspicion d'un variant très rare de l'hémoglobine, le recours à des techniques supplémentaires réalisées en laboratoire spécialisé reste nécessaire pour l'identification.

## BIBLIOGRAPHIE

1. AFNOR (Association Française de Normalisation). Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence. NF EN ISO 15189: décembre 2012.
2. Agouti I, Merono F, Bonello-Palot N, Badens C. Analytical evaluation of the Capillarys 2 Flex piercing for routine haemoglobinopathies diagnosis. *Int J Lab Hematol* 35: 217–221, 2013.
3. Aguilar-Martinez P, Badens C, Bonello-Palot N, Cadet E, Couque N, Ducrocq R, Elion J, Francina A, Joly P, Pissard S, Rochette J, Réseau DHOS Pathologie héréditaire de l'érythrocyte. Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. *Ann Biol Clin (Paris)* 68: 455–464, 2010.
4. Altinier S, Varagnolo M, Zaninotto M, Plebani M. Identification and quantification of hemoglobins in whole blood: the analytical and organizational aspects of Capillarys 2 Flex Piercing compared with agarose electrophoresis and HPLC methods. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC* 51: 791–797, 2013.
5. Ameli (l'Assurance Maladie en ligne). Codage des actes biologiques – NABM. [En ligne]. Disponible sur <http://www.ameli.fr/professionnels-de-sante-/directeurs-de-laboratoires-d-analyses-medicales/index.php>. (Consulté le 09/09/2014).
6. Arlinger L. Analytical isotachopheresis in capillary tubes. Analysis of hemoglobin, hemoglobin cyanide and isoelectric fractions of hemoglobin cyanide. *Biochim Biophys Acta* 393: 396–403, 1975.
7. Arnal C, Girot R. Drépanocytose chez l'adulte. *EMC – Hématologie* 2004: 1-15 (Article 13-006-D-16).
8. Arnaud J, Adjidé V, Vassault A, membres du sous-groupe 2 analytique. Comparaison inter-laboratoire/évaluation externe de la qualité. *Ann Biol Clin (Paris)* 68 Spec No 1: 227–236, 2010.
9. Bachir D. La drépanocytose. *Rev Fr Lab* 2000: 29–35, 2000.
10. Bain BJ. Haemoglobinopathy Diagnosis. 2<sup>ème</sup> Edition. Blackwell Publishing Ed. Oxford. 2008, 328 p.
11. Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. *Blood Rev* 25: 205–213, 2011.
12. Bardakdjian-Michau J. Hémoglobines. *EMC – Biologie médicale* 2007: 1-5 (Article 90-10-0505).

13. Bardakdjian-Michau J. Le dépistage néonatal de la drépanocytose en France. *Arch Pédiatrie* 15: 738–740, 2008.
14. Bardakdjian-Michau J, Dhondt J-L, Ducrocq R, Galactéros F, Guyard A, Huchet F-X, Lahary A, Lena-Russo D, Maboudou P, North M-L, Prehu C, Soummer A-M, Verschelde M, Wajcman H. Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. *Ann Biol Clin (Paris)* 61: 401–409, 2003.
15. Bioimage. Corps de Heinz visibles au bleu de Crésyl Brillant. [En ligne]. Disponible sur [http://bioimage.free.fr/hem\\_image/identite\\_heinz.htm](http://bioimage.free.fr/hem_image/identite_heinz.htm) (Consulté le 21/08/2014).
16. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet* 327: 307–310, 1986.
17. Bland JM, Altman DG. Agreed statistics : measurement method comparison. *Anesthesiology* 116: 182–185, 2012.
18. Blessum C, Jeppsson JO, Aguzzi F, Bernon H, Bienvenu J. L'électrophorèse capillaire : principe et applications au laboratoire de biologie clinique. *Ann Biol Clin (Paris)* 57: 643–57, 1999.
19. Bourée P, Ensaf A. La drépanocytose : une hémoglobinopathie tropicale qui devient cosmopolite. *Option/Bio* 23: 15–17, 2012.
20. Bouzid K, Odièvre M-H, Ithier G, Benkerrou M, Couque N, Elion J, Ducrocq R. Syndromes drépanocytaires atypiques : à propos de deux cas. *Immuno-Anal Biol Spéc* 26: 267–275, 2011.
21. Bruxelles Globule Rouge. Diagnostic. In : Drépanocytose. [En ligne]. Disponible sur [http://erasmeinfo.ulb.ac.be/globule/Francais/drepa\\_diag.htm](http://erasmeinfo.ulb.ac.be/globule/Francais/drepa_diag.htm) (Consulté le 28/07/2014).
22. Charache S, Conley CL, Waugh DF, Ugoretz RJ, Spurrell JR. Pathogenesis of hemolytic anemia in homozygous hemoglobin C disease. *J Clin Invest* 46: 1795–1811, 1967.
23. Chen FT, Liu CM, Hsieh YZ, Sternberg JC. Capillary electrophoresis--a new clinical tool. *Clin Chem* 37: 14–19, 1991.
24. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. *Clin Chem* 46: 1284–1290, 2000.
25. Cofrac (Comité Français d'Accréditation). SH GTA 04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Révision 00 - avril 2011.

26. Cofrac (Comité Français d'Accréditation). SH GTA 14. Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale. Révision 00 - octobre 2011.
27. Cofrac (Comité Français d'Accréditation). SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189: 2007. Révision 03 - septembre 2013.
28. Cofrac (Comité Français d'Accréditation). SH REF 08. Expression et évaluation des portées d'accréditation. Révision 01 - mars 2012.
29. Cotton F, Gulbis B, Hansen V, Vertongen F. Interference of hemoglobin D in hemoglobin A(2) measurement by cation-exchange HPLC. Clin Chem 45: 1317–1318, 1999.
30. Cotton F, Lin C, Fontaine B, Gulbis B, Janssens J, Vertongen F. Evaluation of a Capillary Electrophoresis Method for Routine Determination of Hemoglobins A2 and F. Clin Chem 45: 237–243, 1999.
31. Cotton F, Malaviolle X, Vertongen F, Gulbis B. Evaluation of an automated capillary electrophoresis system in the screening for hemoglobinopathies. Clin Lab 55: 217–221, 2009.
32. Cotton F, Vertongen F, Gulbis B. Électrophorèse capillaire et hémoglobinopathies. Immuno-Anal Biol Spéc 21: 45–50, 2006.
33. Dash S. Hb A2 in subjects with Hb D. Clin Chem 44: 2381–2382, 1998.
34. El Maataoui A, Ouzzif Z. L'hémoglobine C/O<sub>Arabe</sub> : histoire d'une famille. Pathol Biol 60: 320–321, 2012.
35. Farce M-H. Génétique moléculaire. Editions Quae. Paris. 2000, 262 p.
36. Giambona A, Passarello C, Renda D, Maggio A. The significance of the hemoglobin A2 value in screening for hemoglobinopathies. Clin Biochem 42: 1786–1796, 2009.
37. Giroud C, Arnaud J, Vassault A, membres du sous-groupe 2 analytique. Incertitude de mesure. Ann Biol Clin (Paris) 68 Spec No 1: 237–245, 2010.
38. Godeau B, Galactéros F. Principales hémoglobinopathies. EMC – AKOS (Traité de Médecine) 2003: 1-6 (Article 4-0040).
39. Greene DN, Pyle AL, Chang JS, Hoke C, Lorey T. Comparison of Sebia Capillarys Flex capillary electrophoresis with the BioRad Variant II high pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. Clin Chim Acta 413: 1232–1238, 2012.

40. Grenier B, Dubreuil M, Journois D. Comparaison de deux méthodes de mesure d'une même grandeur : méthode de Bland et Altman. *Ann Fr Anesth Réanimation* 19: 128–135, 2000.
41. Guis L, Chaumier A, Gall VL, Havrez S. Intégration du Capillarys 2 Flex Piercing (Sebia) dans un laboratoire de biologie médicale spécialisée. *Rev Francoph Lab* 2013: 47–56, 2013.
42. Gulbis B, Cotton F, Vertongen F. Hémoglobines anormales rares. EMC – Hématologie 2004: 1-8 (Article 13-006-D-15).
43. Harano K, Harano T. Simple and rapid analysis of beta-thalassemia mutation by sequence-specific amplification. *Rinsho Byori* 61: 217–223, 2013.
44. Harteveld CL. State of the art and new developments in molecular diagnostics for hemoglobinopathies in multiethnic societies. *Int. J. Lab. Hematol* 36: 1–12, 2014.
45. HAS (Haute Autorité de Santé). Syndromes drépanocytaires majeurs et intermédiaires. Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. Juin 2008. [En ligne]. Disponible sur [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_680242/fr/ald-n-10](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_680242/fr/ald-n-10). (Consulté le 21/04/2014).
46. Hempe JM, Craver RD. Separation of hemoglobin variants with similar charge by capillary isoelectric focusing: value of isoelectric point for identification of common and uncommon hemoglobin variants. *Electrophoresis* 21: 743–748, 2000.
47. Hempe JM, Granger JN, Warrier RP, Craver RD. Analysis of hemoglobin variants by capillary isoelectric focusing. *J Capillary Electrophor* 4: 131–135, 1997.
48. Henny J, Arnaud J, Giroud C, Vassault A, membres du sous-groupe 2 analytique. Intervalles de référence : détermination et vérification. *Ann Biol Clin (Paris)* 68 Spec No 1: 305–313, 2010.
49. Higgins TN, Khajuria A, Mack M. Quantification of HbA2 in Patients With and Without  $\beta$ -Thalassemia and in the Presence of HbS, HbC, HbE, and HbD Punjab Hemoglobin Variants Comparison of Two Systems. *Am J Clin Pathol* 131: 357–362, 2009.
50. Higgins TN, Mack M, Khajuria A. Comparison of two methods for the quantification and identification of hemoglobin variants. *Clin Biochem* 42: 701–705, 2009.
51. Jeanne L. Place de l'électrophorèse capillaire dans le diagnostic et le suivi des hémoglobinopathies. *Option/Bio* 21: 17–20, 2010.
52. Jenkins MA, Hendy J, Smith IL. Evaluation of hemoglobin A2 quantitation assay and hemoglobin variant screening by capillary electrophoresis. *J Capillary Electrophor* 4: 137–143, 1997.

53. Journois D. Concordance de deux variables : l'approche graphique: Méthode de Bland et Altman. *Rev Mal Respir* 21: 127–130, 2004.
54. Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, Ou C-N, Bak R. Comparison of Sebia Capillarys Capillary Electrophoresis With the Primus High-Pressure Liquid Chromatography in the Evaluation of Hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol* 130: 824–831, 2008.
55. Kim J-E, Kim B-R, Woo K-S, Kim J-M, Park J-I, Han J-Y. Comparison of capillary electrophoresis with cellulose acetate electrophoresis for the screening of hemoglobinopathies. *Korean J Lab Med* 31: 238–243, 2011.
56. Krause A, Wainstein T, Essop FB, Goodyear Q. Testing for haemoglobinopathies in Johannesburg, South Africa: A 30-year review. *S Afr Med J* 103: 989–993, 2013.
57. Labie D. Analyse génotypique au cours des hémoglobinopathies. *Rev Fr Lab* 1995: 117–120, 1995.
58. Labie D, Elion J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC - Hématologie* 1: 1–15, 2006.
59. Laboratoire suisse d'Analyse du Dopage CHUV Lausanne. L'électrophorèse capillaire. In : Prestations de laboratoire - Appareils & technologies. [En ligne]. Disponible sur [http://www.doping.chuv.ch/lad\\_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestations-laboratoire-appareils/lad-prestations-laboratoire-appareils-ec.htm](http://www.doping.chuv.ch/lad_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestations-laboratoire-appareils/lad-prestations-laboratoire-appareils-ec.htm) (Consulté le 02/05/2014).
60. Leblanc R-M. Documentation externe et validation des méthodes. *Option/Bio* 24: 22–24, 2013.
61. Le Carrer D, Bach-Ngohou K. L'électrophorèse capillaire automatisée en biologie clinique. *Spectra Biol* 24: 47–52, 2005.
62. Le Vacon F, Trapadoux F, Ferney L, Ferrera V, Asso Bonnet M, Hergon E. La validation de méthode : une étape incontournable au laboratoire. *Transfus Clin Biol* 20: 361, 2013.
63. Lin C, Cotton F, Fontaine B, Gulbis B, Janssens J, Vertongen F. Capillary zone electrophoresis: an additional technique for the identification of hemoglobin variants. *Hemoglobin* 23: 97–109, 1999.
64. Lionnet F, Arlet J-B, Bartolucci P, Habibi A, Ribeil J-A, Stankovic K. Recommandations pratiques de prise en charge de la drépanocytose de l'adulte. *Rev Médecine Interne* 30: S162–S223, 2009.
65. Louahabi A, Philippe M, Lali S, Wallemacq P, Maisin D. Evaluation of a new Sebia kit for analysis of hemoglobin fractions and variants on the Capillarys system. *Clin Chem Lab Med* 44: 340–345, 2006.

66. Mais DD, Gulbranson RD, Keren DF. The Range of Hemoglobin A2 in Hemoglobin E Heterozygotes as Determined by Capillary Electrophoresis. *Am J Clin Pathol* 132: 34–38, 2009.
67. Mario N, Baudin B, Aussel C, Giboudeau J. Capillary isoelectric focusing and high-performance cation-exchange chromatography compared for qualitative and quantitative analysis of hemoglobin variants. *Clin Chem* 43: 2137–2142, 1997.
68. Mario N, Baudin B, Bruneel A, Janssens J, Vaubourdolle M. Capillary Zone Electrophoresis for the Diagnosis of Congenital Hemoglobinopathies. *Clin Chem* 45: 285–288, 1999.
69. Moiz B, Hashmi MR, Nasir A, Rashid A, Moatter T. Hemoglobin E syndromes in Pakistani population. *BMC Blood Disord* 12: 3, 2012.
70. Molteni S, Frischknecht H, Thormann W. Application of dynamic capillary isoelectric focusing to the analysis of human hemoglobin variants. *Electrophoresis* 15: 22–30, 1994.
71. Montalembert M de. Syndromes thalassémiques. *EMC – Hématologie* 2002: 1-8 (Article 13-006-D-17).
72. Nagara M, Alba-Sauviat C, Simeon D, Gaudeau-Toussaint M-F, Fontvielle F, Faucher G. L'hémoglobinoïse C homozygote : à propos d'un cas de découverte fortuite. *Immuno-Anal Biol Spéc* 24: 210–216, 2009.
73. North M-L, Piffaut M-C, Duwig I. Hémoglobinoïpathies : actualisation du diagnostic biologique. *Rev Fr Lab* 1995: 107–116, 1995.
74. Ou C-N, Rognerud CL. Diagnosis of hemoglobinoïpathies: electrophoresis vs. HPLC. *Clin Chim Acta* 313: 187–194, 2001.
75. Paleari R, Gulbis B, Cotton F, Mosca A. Interlaboratory comparison of current high-performance methods for HbA2. *Int J Lab Hematol* 34: 362–368, 2012.
76. Piel FB, Howes RE, Patil AP, Nyangiri OA, Gething PW, Bhatt S, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI. The distribution of haemoglobin C and its prevalence in newborns in Africa. *Sci Rep* 3, 2013.
77. Rosa J, Wajcman H, Blouquit Y. Hémoglobine. *EMC – Hématologie* 1993: 1-0 (Article 13-000-S-10).
78. Steinberg P, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. Disorders of Hemoglobin : Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. 2<sup>ème</sup> Edition. Cambridge University Press Ed. 2009, 846 p.

79. Saadi H, Alexander S, Barlow P, Van Regemorter N, Gulbis B, Thomas D. Alpha-thalassémie majeure : à propos d'un cas de dépistage anténatal et revue de la littérature. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod* 38: 258–262, 2009.
80. Sachdev R, Dam A. High performance liquid chromatography as an aid in picking up hemoglobin H disease. *Indian J Pathol Microbiol* 53: 861, 2010.
81. Siguret V, Andreux J-P. Diagnostic biologique des hémoglobinopathies par analyse du phénotype. *Ann Biol Clin (Paris)* 55: 103–12, 1997.
82. Suh DD, Krauss JS, Bures K. Influence of hemoglobin S adducts on hemoglobin A2 quantification by HPLC. *Clin Chem* 42: 1113–1114, 1996.
83. Tatu T, Gategasem P, Hathirat P. Hemoglobin typing by high performance liquid chromatography. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 28: 417–423, 1997.
84. Trivin F, Le Bricon T. Nouvelles techniques d'électrophorèse : applications aux protéines et à l'ADN. *Immuno-Anal Biol Spéc* 18: 11–22, 2003.
85. Vassault A, Grafmeyer D, Graeve J de, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Ann Biol Clin (Paris)* 57: 685–95, 1999.
86. Vassault A, Hulin A, Chapuzet E, Arnaud J, Giroud C, membres du sous-groupe 2 analytique de la SFBC. Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse. *Ann Biol Clin (Paris)* 68 Spec No 1: 247–294, 2010.
87. Wajcman H. Hémoglobines : structure et fonction. *EMC - Hématologie* 2: 145–157, 2005.
88. Waneesorn J, Panyasai S, Kongthai K, Singbootra P, Pornprasert S. Comparison between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for detection and quantification of Hb constant spring [Hb CS;  $\alpha 142$ , Term→Gln (TAA>CAA IN  $\alpha 2$ )]. *Hemoglobin* 35: 338–345, 2011.
89. Westgard QC. Desirable Biological Variation Database specifications. [En ligne]. Disponible sur <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>. (Consulté le 07/01/2014).
90. Winichagoon P, Svasti S, Munkongdee T, Chaiya W, Boonmongkol P, Chantrakul N, Fucharoen S. Rapid diagnosis of thalassemias and other hemoglobinopathies by capillary electrophoresis system. *Transl Res J Lab Clin Med* 152: 178–184, 2008.
91. Wiwanitkit V. Hemoglobin E disorder: Newborn screening program. *Indian J Hum Genet* 19: 279–281, 2013.



92. Yang Z, Chaffin CH, Easley PL, Thigpen B, Reddy VVB. Prevalence of Elevated Hemoglobin A2 Measured by the CAPILLARYS System. *Am J Clin Pathol* 131: 42–48, 2009.
93. Yatim NFM, Rahim MA, Menon K, Al-Hassan FM, Ahmad R, Manocha AB, Saleem M, Yahaya BH. Molecular Characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Thalassaemia among Malay Patients. *Int J Mol Sci* 15: 8835–8845, 2014.

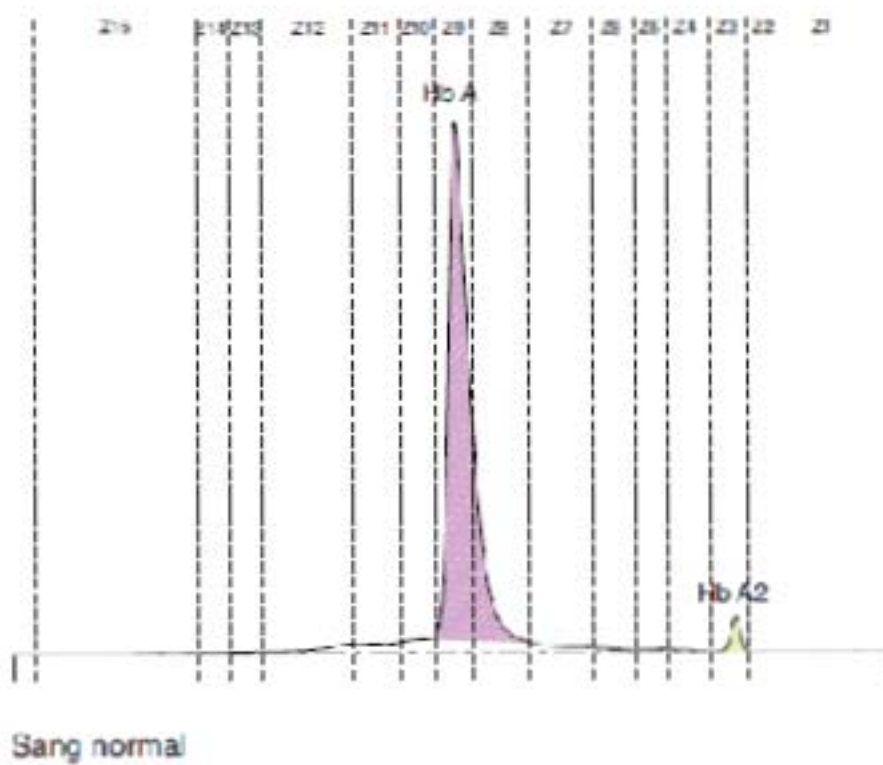
# ANNEXES

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des variants potentiels dans chaque zone.

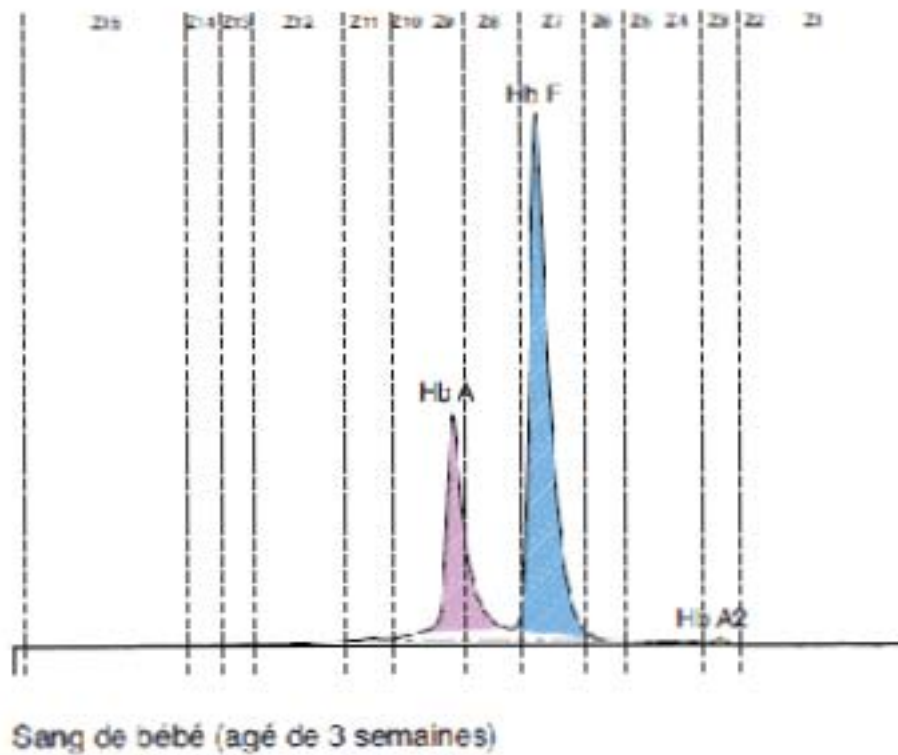
Zone	Hémoglobines / Hemoglobins (Hb)
21	<p>Hb Santa Ana (chaîne libre alpha), Hb Mizuno (pic mineur), Hb SA2, Hb aA2, Hb F-Hill, Hb T-Cambodia, variants de Hb A2 "Arya", de Hb A2 "Hasharon", de Hb A2 "Fort de France", de Hb A2 "Ottawa", de Hb A2 "Chad", de Hb A2 "Q-Norfolk", de Hb A2 "Matsue-Oki", de Hb A2 "Stanleyville II", de Hb A2 "Montgomery", de Hb A2 "Winnipeg", de Hb A2 "Q-India", de Hb A2 "Q-Pest", de Hb A2 "Memphis", de Hb A2 "Inkster", de Hb A2 "Chapel Hill" et de Hb A2 "Q-Thailand"</p> <p><i>Hb Santa Ana (free alpha chain), Hb Mizuno (minor peak), Hb SA2, Hb aA2, Hb F-Hill, Hb T-Cambodia, "Arya" Hb A2 variant, "Hasharon" Hb A2 variant, "Fort de France" Hb A2 variant, "Ottawa" Hb A2 variant, "Chad" Hb A2 variant, "Q-Norfolk" Hb A2 variant, "Matsue-Oki" Hb A2 variant, "Stanleyville II" Hb A2 variant, "Montgomery" Hb A2 variant, "Winnipeg" Hb A2 variant, "Q-India" Hb A2 variant, "Q-Pest" Hb A2 variant, "Memphis" Hb A2 variant, "Inkster" Hb A2 variant, "Chapel Hill" Hb A2 variant, "Q-Thailand" Hb A2 variant</i></p>
22	<p>Hb C, Hb F-Texas, Hb Constant Spring, Hb C-Haram (C-Georgetown), variant de Hb A2 "Saito", variant de Hb A2 "Bassett", variant de Hb A2 "Swan River", variant de Hb A2 "Manitoba I", variant de Hb A2 "Manitoba II"</p> <p><i>Hb C, Hb F-Texas, Hb Constant Spring, Hb C-Haram (C-Georgetown), "Saito" Hb A2 variant, "Bassett" Hb A2 variant, "Swan River" Hb A2 variant, "Manitoba I" Hb A2 variant, "Manitoba II" Hb A2 variant</i></p>
23	<p>Hb A2, Hb O-Arab, Hb Chad (E-Kaating), Hb E-Saskatoon</p> <p><i>Hb A2, Hb O-Arab, Hb Chad (E-Kaating), Hb E-Saskatoon</i></p>
24	<p>Hb E, Hb KIn (Ube-1), Hb Buenos Aires (pic mineur), Hb Agnogi, Hb G-Siraj, Hb Santa Ana, Hb A2-Batanga, Hb M-Saskatoon (pic mineur), variant de Hb A2 "M-wale", Hb C dégradée</p> <p><i>Hb E, Hb KIn (Ube-1), Hb Buenos Aires (minor peak), Hb Agnogi, Hb G-Siraj, Hb Santa Ana, Hb A2-Batanga, Hb M-Saskatoon (minor peak), "M-wale" Hb A2 variant, denatured Hb C</i></p>
25	<p>Hb S, Hb Dhofer (Yukhashii), Hb Arya, Hb Hasharon (Sinai), Hb Handsworth, Hb Ottawa (Siam), Hb S-Antilles, Hb Fort de France, Hb Hamadan, Hb Montgomery, variant de Hb A2 "Lombard", variant de Hb A2 "Cemenelum", variant de Hb A2 "Jackson", Hb O-Arab dégradée</p> <p><i>Hb S, Hb Dhofer (Yukhashii), Hb Arya, Hb Hasharon (Sinai), Hb Handsworth, Hb Ottawa (Siam), Hb S-Antilles, Hb Fort de France, Hb Hamadan, Hb Montgomery, "Lombard" Hb A2 variant, "Cemenelum" Hb A2 variant, "Jackson" Hb A2 variant, denatured Hb O-Arab</i></p>
26	<p>Hb D-Punjab (D-Los Angeles), Hb Stanleyville II, Hb Oso Christiansborg, Hb Leiden, Hb G-Philadelphia, Hb Muravera, Hb D-Bushman, Hb G-Norfolk, Hb Matsue-Oki, Hb D-Oued Raftah, Hb Lepore (Lepore-BW), Hb Muskegon, Hb D-Badan, Hb Buenos Aires (pic mineur), Hb Summer Hill, Hb Q-India, Hb Q-Iran, Hb Koda-Bu (G-Accra), Hb Köln, Hb Fort Worth, Hb G-Taipei, Hb Winnipeg, Hb G-Siraj, Hb G-Pest, Hb Q-Iran, Hb G-Coushatta (G-Saskatoon), Hb Inkster, Hb Saito, Hb Memphis, Hb P-Nilotic, Hb Williams, variant de Hb A2 "J-Rajappa", variant de Hb A2 "J-Anatolia", variant de Hb A2 "J-Oxford", variant de Hb A2 "J-Broussais", variant de Hb A2 "J-Toronto", variant de Hb A2 "Maxim", variant de Hb A2 "J-Habana", variant de Hb A2 "J-Bovigo", Hb E dégradée</p> <p><i>Hb D-Punjab (D-Los Angeles), Hb Stanleyville II, Hb Oso Christiansborg, Hb Leiden, Hb G-Philadelphia, Hb Muravera, Hb D-Bushman, Hb G-Norfolk, Hb Matsue-Oki, Hb D-Oued Raftah, Hb Lepore (Lepore-BW), Hb Muskegon, Hb D-Badan, Hb Buenos Aires (minor peak), Hb Summer Hill, Hb Q-India, Hb Q-Iran, Hb Koda-Bu (G-Accra), Hb Köln, Hb Fort Worth, Hb G-Taipei, Hb Winnipeg, Hb G-Siraj, Hb G-Pest, Hb Q-Iran, Hb G-Coushatta (G-Saskatoon), Hb Inkster, Hb Saito, Hb Memphis, Hb P-Nilotic, Hb Williams, "J-Rajappa" Hb A2 variant, "J-Anatolia" Hb A2 variant, "J-Oxford" Hb A2 variant, "J-Broussais" Hb A2 variant, "J-Toronto" Hb A2 variant, "Maxim" Hb A2 variant, "J-Habana" Hb A2 variant, "J-Bovigo" Hb A2 variant, denatured Hb E</i></p>
27	<p>Hb F, Hb Q-Thailand (Q-Tachung), Hb Alabama, Hb Chapel Hill, Hb Bassett, Hb G-San José, Hb Richmond, Hb Barcelona, Hb Geldrop Santa Anna, Hb Porto Alegre, Hb Swan River, Hb Presbyterian, Hb Burke, Hb Manitoba I, Hb Manitoba II, variant de Hb A2 "J-Paris-I", Hb S dégradée</p> <p><i>Hb F, Hb Q-Thailand (Q-Tachung), Hb Alabama, Hb Chapel Hill, Hb Bassett, Hb G-San Jose, Hb Richmond, Hb Barcelona, Hb Geldrop Santa Anna, Hb Porto Alegre, Hb Swan River, Hb Presbyterian, Hb Burke, Hb Manitoba I, Hb Manitoba II, "J-Paris-I" Hb A2 variant, denatured Hb S</i></p>
28	<p>Hb F ankylosé, Hb Hinsdale, Hb Alberta, Hb Kempey, Hb Atlanta, Hb Athens-GA (Waco)</p> <p><i>Ankylosed Hb F, Hb Hinsdale, Hb Alberta, Hb Kempey, Hb Atlanta, Hb Athens-GA (Waco)</i></p>
29	<p>Hb A, Hb Goroishi (Hitchingbrook), Hb Phnom Penh, Hb Silver Springs, Hb La Corona, Hb Bougainville-Mali, Hb Austin, Hb Buenos Aires (pic majeur), Hb Chicago, Hb Toulon, Hb Okayama, Hb Fontainebleau, Hb Raleigh, Hb Hekinan, Hb Mosala, Hb Dallas, Hb Artec, Hb Little Rock, Hb Frankfurt, Hb Bethesda, Hb M-Boston (M-Osaka), Hb Bishane (Great Lakes), Hb Mizuno, Hb Grange Blanche, Hb San Diego, Hb M-Saskatoon (pic majeur), Hb Malmé, Hb Minneapolis Laos, Hb Syracuse, Hb Campdown</p> <p><i>Hb A, Hb Goroishi (Hitchingbrook), Hb Phnom Penh, Hb Silver Springs, Hb La Corona, Hb Bougainville-Mali, Hb Austin, Hb Buenos Aires (major peak), Hb Chicago, Hb Toulon, Hb Okayama, Hb Fontainebleau, Hb Raleigh, Hb Hekinan, Hb Mosala, Hb Dallas, Hb Artec, Hb Little Rock, Hb Frankfurt, Hb Bethesda, Hb M-Boston (M-Osaka), Hb Bishane (Great Lakes), Hb Mizuno, Hb Grange Blanche, Hb San Diego, Hb M-Saskatoon (major peak), Hb Malmé, Hb Minneapolis Laos, Hb Syracuse, Hb Campdown</i></p>
210	<p>Hb Hope, Hb M-Iwale (M-Kankakee), Hb Camden (Tokuchi)</p> <p><i>Hb Hope, Hb M-Iwale (M-Kankakee), Hb Camden (Tokuchi)</i></p>

Zona	Hémoglobines / Hemoglobins (Hb)
Z11	Hb A dégradée, Hb Providence (pic X-Asn), Hb K-Woolwich, Hb Lombard, Hb Kaohsiung (New York), Hb Fennin Lubbock, Hb Andrew Minneapolis, Hb Jackson, Hb Himaji, variant de Hb A2 "I (I-Texas)"
	<i>Denatured Hb A, Hb Providence (X-Asn peak), Hb K-Woolwich, Hb Lombard, Hb Kaohsiung (New York), Hb Fennin Lubbock, Hb Andrew Minneapolis, Hb Jackson, Hb Himaji, "I (I-Texas)" Hb A2 variant</i>
Z12	Hb Bait, Hb Cemenelum, Hb J-Calabria (J-Bait), Hb Providence (pic X-Asp), Hb J-Rajappan, Hb Grady, Hb J-Anatolia, Hb J-Broussais (Tagawa-I), Hb J-Chicago, Hb J-Oxford (J-Interlaken), Hb J-Toronto, Hb J-Meinung (J-Bangkok), Hb Ube-2, Hb Mexico (J-Paris-II), Hb J-Habana, Hb J-Baltimore (N-New Haven), Hb J-Paris-I (J-Njizur)
	<i>Hb Bait's, Hb Cemenelum, Hb J-Calabria (J-Bait), Hb Providence (X-Asp peak), Hb J-Rajappan, Hb Grady, Hb J-Anatolia, Hb J-Broussais (Tagawa-I), Hb J-Chicago, Hb J-Oxford (J-Interlaken), Hb J-Toronto, Hb J-Meinung (J-Bangkok), Hb Ube-2, Hb Mexico (J-Paris-II), Hb J-Habana, Hb J-Baltimore (N-New Haven), Hb J-Paris-I (J-Njizur)</i>
Z13	Hb J-Povigo, Hb N-Baltimore (Hopkins-I), Hb J-Norfolk (Kagoshima), Hb J-Kaohsiung (J-Honolulu)
	<i>Hb J-Povigo, Hb N-Baltimore (Hopkins-I), Hb J-Norfolk (Kagoshima), Hb J-Kaohsiung (J-Honolulu)</i>
Z14	Hb N-Seattle
	<i>Hb N-Seattle</i>
Z15	Hb H, Hb I (I-Texas)
	<i>Hb H, Hb I (I-Texas)</i>

## Annexe 2 : Profil électrophorétique normal de l'adulte.

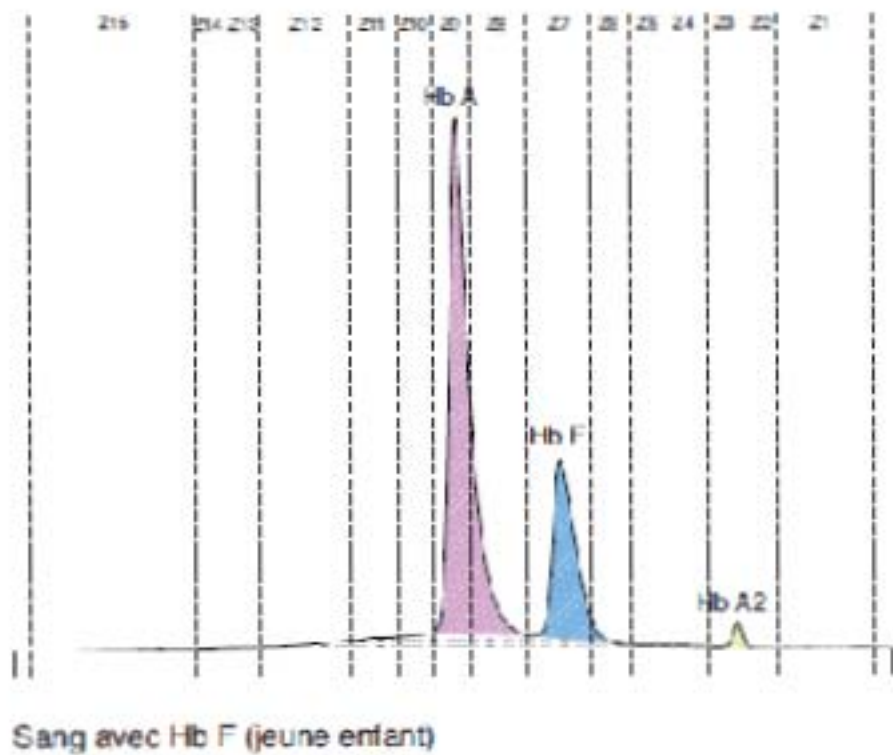


### Annexe 3 : Profil électrophorétique normal du nouveau-né.

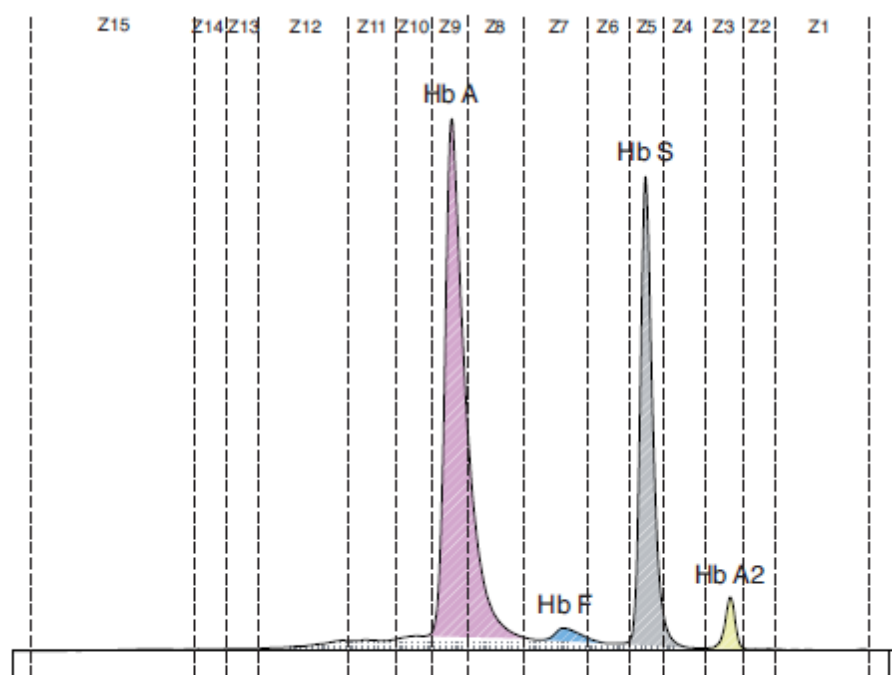




**Annexe 4 : Profil électrophorétique normal du jeune enfant, âgé de quelques mois.**

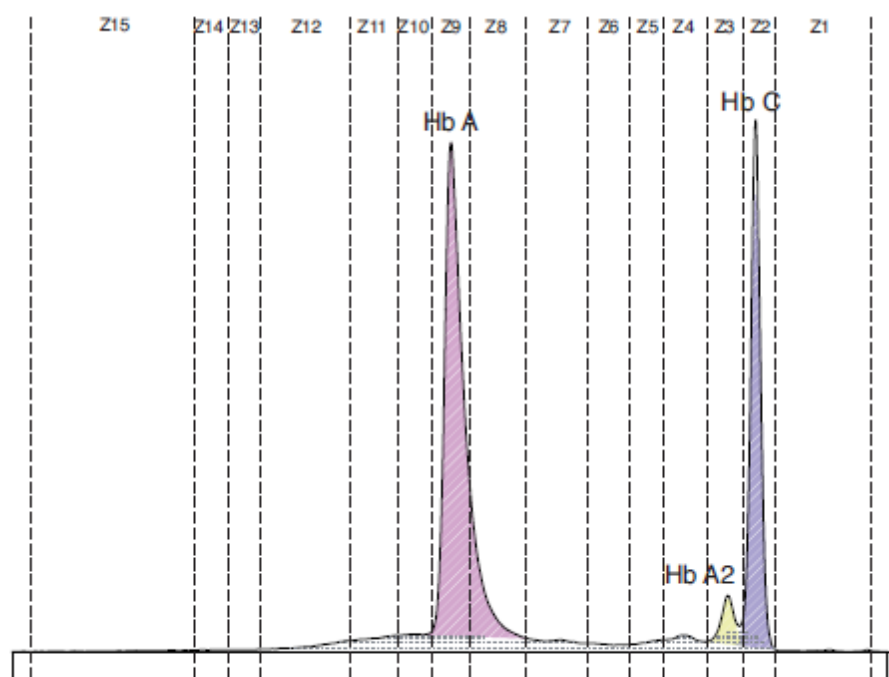


## Annexe 5 : Profil électrophorétique anormal avec Hb S.



Sang avec variant hétérozygote Hb S

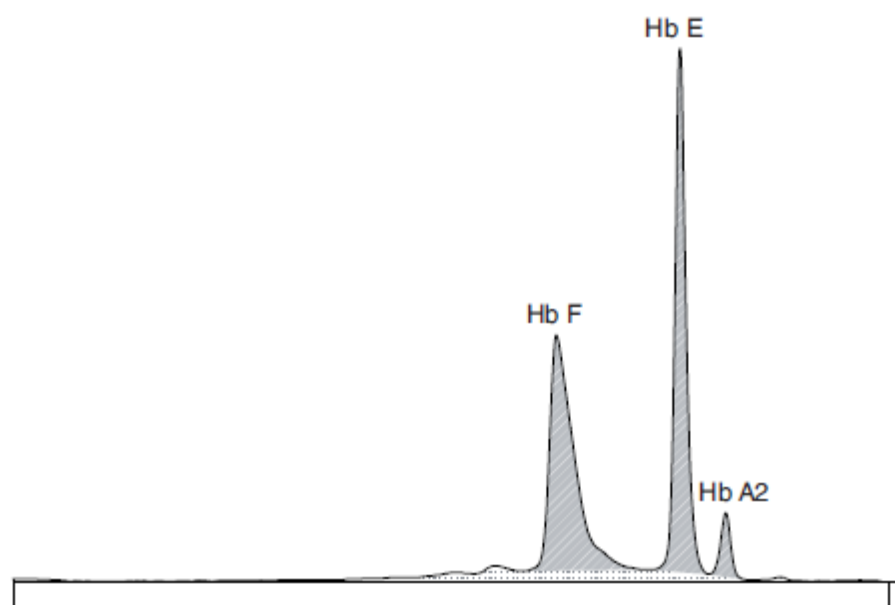
## Annexe 6 : Profil électrophorétique anormal avec Hb C.



Sang avec variant Hb C

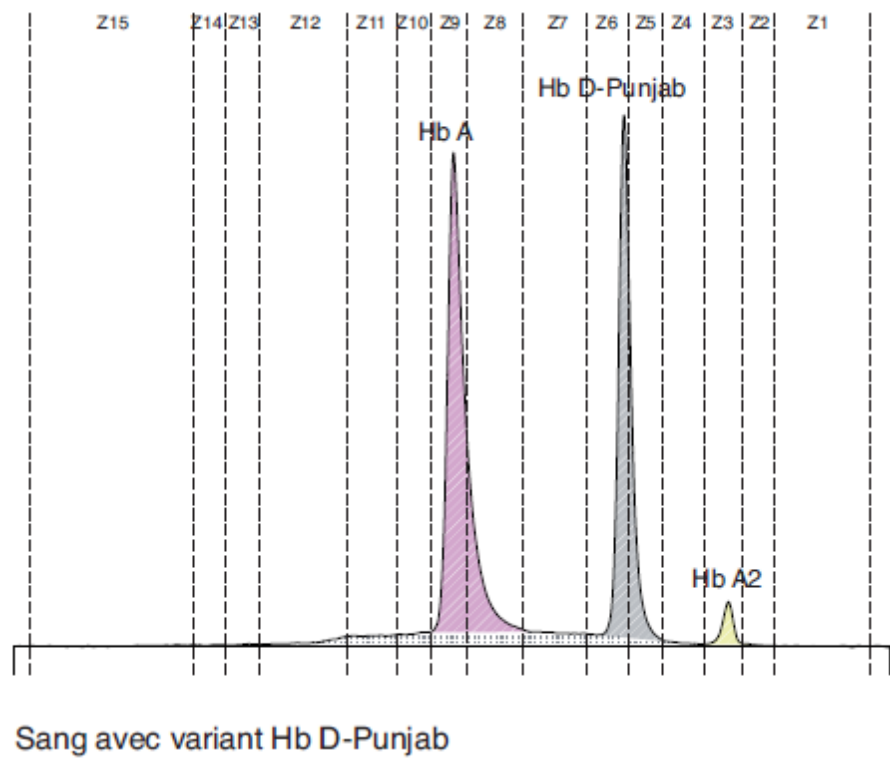


### Annexe 7 : Profil électrophorétique anormal avec Hb E.

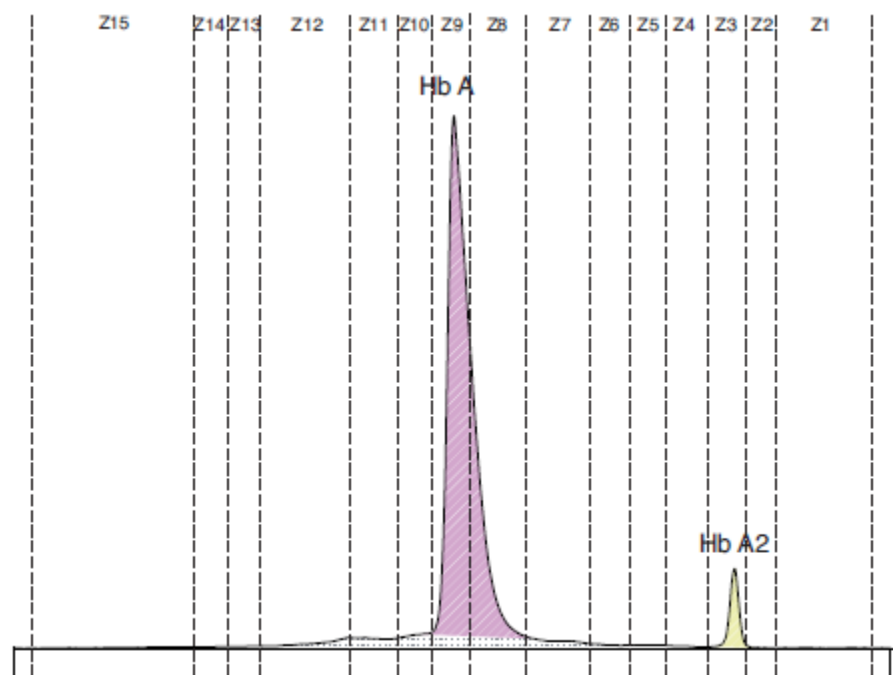


Sang avec variant homozygote Hb E et fraction Hb F élevée

**Annexe 8 : Profil électrophorétique anormal avec Hb D-Punjab.**

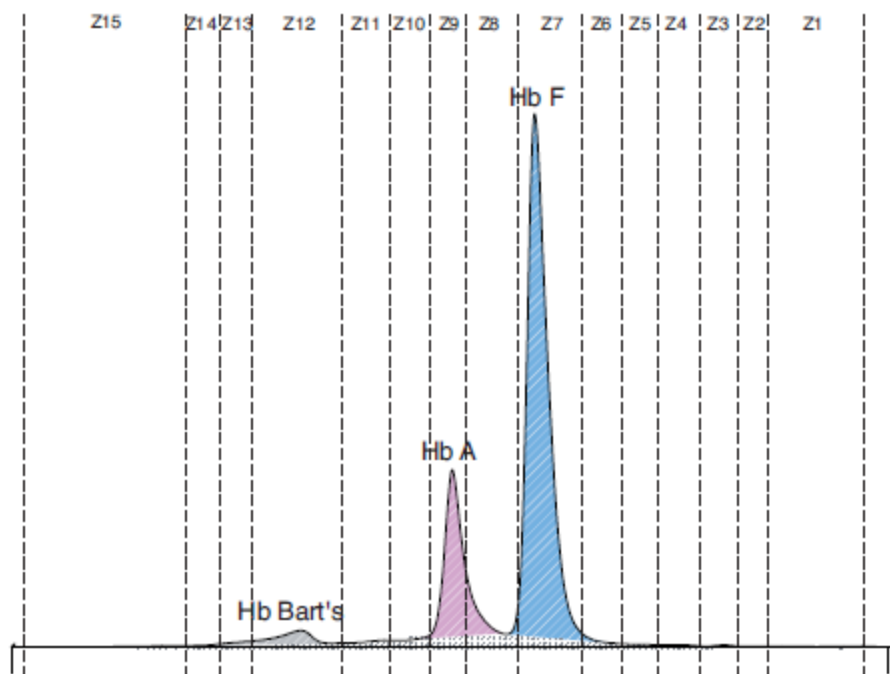


**Annexe 9 : Profil électrophorétique anormal avec augmentation de la fraction d'Hb A2.**



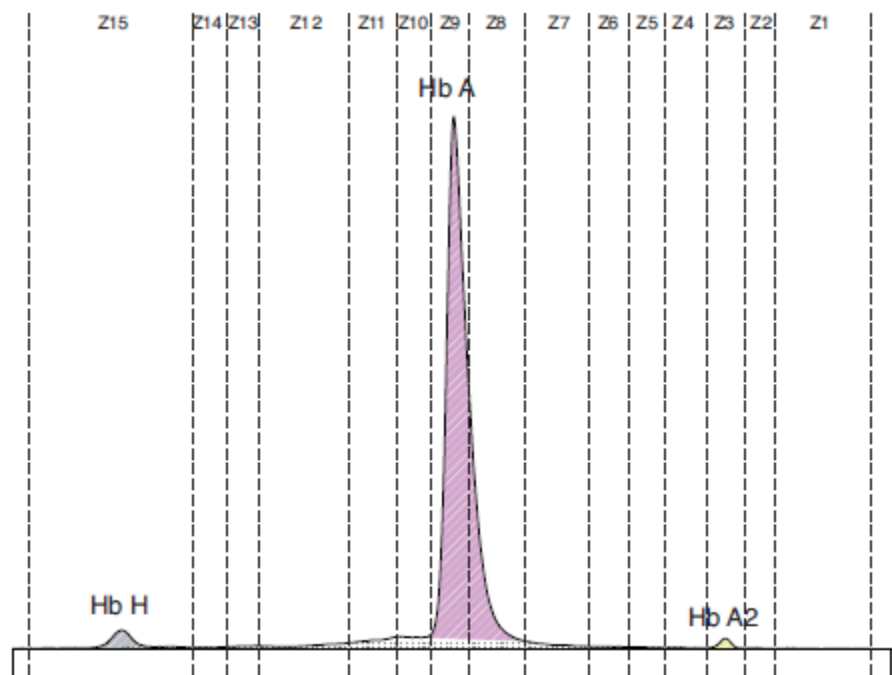
Sang bêta-thalassémique

**Annexe 10 : Profil électrophorétique anormal d'un nouveau-né avec Hb Bart's ( $\alpha$ -thalassémie).**



Sang de bébé avec Hb Bart's

**Annexe 11 : Profil électrophorétique anormal avec Hb H ( $\alpha$ -thalassémie).**



Sang avec Hb H

**Annexe 12 : Méthode « CIQ/EEQ » pour l'évaluation de l'incertitude de mesure (extrait du SH GTA 14) (26).**

L'incertitude sur le résultat d'analyse est obtenue en prenant la racine carrée de la somme quadratique des composantes de l'incertitude issues du CIQ et de l'EEQ :

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$$

- $u^2(CIQ)$  : représente la variance (carré de l'écart-type) de l'ensemble des résultats du contrôle interne de qualité (CIQ) ;
- $u^2(EEQ)$  : variance liée à la justesse (biais).

L'utilisation de CIQ externalisés est une alternative à l'évaluation d'une justesse lorsqu'il n'existe pas d'EEQ satisfaisant ou quand l'EEQ n'est pas exploitable :

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(CIQ_{\text{externalisé}})}$$

- $u^2(CIQ_{\text{externalisé}})$  : variance liée à la justesse

Les limites du CIQ externalisé :

- moyenne qui lisse le biais ;
- même échantillon utilisé pour les deux termes ;
- valeur cible connue ;
- ...

La fidélité intermédiaire se quantifie par le coefficient de variation issu du CIQ. Le coefficient de variation (CV%) se calcule à partir de l'écart-type et de la moyenne des résultats d'un CIQ :

$$\hat{\sigma}_{\text{fidélité-intermédiaire}} = u(CIQ) = \frac{CV \times m}{100}$$

L'indicateur de variabilité (CV ou écart-type du CIQ) sert à estimer la variabilité du processus analytique. Cette variabilité pour être représentative devra prendre en compte des résultats de CIQ sur une période suffisamment longue.

Le laboratoire utilisera les valeurs de plusieurs EEQ ou les valeurs des CIQ externalisés :

Pour chaque comparaison inter-laboratoires  $i$ , on obtient le biais suivant :

$$E_i = (X_{lab} - X_{ref})$$

- $X_{lab}$  : résultat du laboratoire ;
- $X_{ref}$  : valeur assignée de la comparaison ;
- $E$  : écart entre le résultat du laboratoire et la valeur assignée.

Soit  $n$  le nombre de comparaisons étudiées, la moyenne de l'écart est :

$$\bar{E} = \frac{\sum_i (X_{lab} - X_{ref})_i}{n}$$

$$\hat{\sigma}_E = \sqrt{\frac{\sum_i (E_i - \bar{E})^2}{n - 1}}$$

- $\hat{\sigma}_E$  écart-type des écarts entre le résultat du laboratoire et la valeur assignée.

L'incertitude évaluée à partir des évaluations externes est obtenue à partir de la valeur absolue de l'écart moyen associé de la loi de distribution uniforme (on divise la demi-étendue par racine de 3) et de l'écart-type des écarts précédemment calculé. La formule de calcul est la suivante :

$$u(EEQ) = \sqrt{\left(\frac{|\bar{E}|}{\sqrt{3}}\right)^2 + \hat{\sigma}_E^2}$$

On obtient :

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$$

$$u(C) = \sqrt{\left(\frac{CV \times m}{100}\right)^2 + \left(\frac{\bar{E}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \hat{\sigma}_E^2}$$

- $C$  : concentration de l'analyte dans l'échantillon patient [mmol/L] ou tout autre mesurande.

Des exemples sont traités au paragraphe 10.

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 13 octobre 2014

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE

présenté par Valérie GUERARD

Sujet : Mise en place de l'électrophorèse capillaire - Minicap  
SEBIA pour le diagnostic des hémoglobinopathies au CHU de  
Nancy

Jury :

Président : Pr FAIVRE Béatrice, PU, Pharmacien, Université de  
Lorraine

Directeur : Dr PERRIN Julien, MCU-PH, Pharmacien, Université  
de Lorraine, CHU Nancy

Juges : Pr NGUYEN Philippe, PU-PH, Médecin biologiste  
Université de RCA, CHU Reims  
Dr SALIGNAC Sylvain, PH, Pharmacien-biologiste,  
CHU Nancy

Vu,

Nancy, le 10 septembre 2014

Le Président du Jury

Directeur de Thèse



B. FAIVRE



J. PERRIN

Vu et approuvé,

Nancy, le 19.09.2014

Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université de Lorraine,

  
Francine PAULUS  
FACULTE DE PHARMACIE

Vu,

Nancy, le 26 SEP. 2014

Le Président de l'Université de Lorraine,



Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement :

6672



**N° d'identification :**

**TITRE**

**Mise en place de l'électrophorèse capillaire MINICAP® (Sebia) pour le diagnostic des hémoglobinopathies au CHU de Nancy**

**Thèse soutenue le 13 Octobre 2014**

**Par Valérie GUERARD**

**RESUME :**

Les hémoglobinopathies, définies par la présence d'anomalies qualitatives et/ou quantitatives des chaînes de globine, figurent parmi les maladies génétiques les plus fréquentes dans le monde. Historiquement endémiques dans certains pays d'Afrique et d'Asie, elles sont devenues cosmopolites suite aux différents flux migratoires ces dernières décennies. Leur diagnostic repose sur la clinique, l'origine ethnique, les antécédents familiaux et la mise en évidence d'anomalies biologiques au niveau de l'héмограмme, du frottis sanguin et de l'étude de l'hémoglobine.

Selon la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (code 1120), la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine doit se faire par 3 techniques minimum, dont une technique électrophorétique. Au laboratoire d'Hématologie Biologique du CHU de Nancy, la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine s'effectue par CLHP et électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin en première intention. En cas de difficulté d'interprétation, une technique complémentaire, l'électrophorèse en gel d'agarose à pH acide, est réalisée, de même que le test d'Itano pour confirmation de la présence d'hémoglobine S.

Suite à la publication de nouvelles recommandations pour l'étude de l'hémoglobine par le réseau « Pathologie héréditaire de l'érythrocyte » en 2010, plaçant l'électrophorèse capillaire en première ligne, le laboratoire du CHU de Nancy a décidé de remplacer l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin par l'électrophorèse capillaire Minicap® (Sebia), dont nous avons étudié les performances. Les résultats obtenus ont été satisfaisants et conformes à nos spécifications. Nous avons également montré que l'électrophorèse capillaire et l'électrophorèse sur acétate de cellulose permettent une identification équivalente des différentes fractions de l'hémoglobine, le système Minicap® présentant en outre plusieurs avantages (sensibilité et spécificité plus élevées, automatisation, quantification des fractions). Nous avons enfin comparé l'électrophorèse capillaire et la CLHP, toutes deux destinées à être utilisées en première intention. Nos résultats ont démontré leur complémentarité pour les principales anomalies de l'hémoglobine rencontrées en situation clinique, confirmant alors l'intérêt de la nouvelle stratégie adoptée.

**MOTS CLES :** hémoglobinopathies - électrophorèse capillaire MINICAP® - diagnostic biologique - variant de l'hémoglobine – thalassémie - comparaison de méthodes - chromatographie liquide de haute performance.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr PERRIN Julien, MCU-PH	Faculté de Pharmacie de Nancy Université de Lorraine  Service d'Hématologie Biologique CHU de Nancy	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
		Thème 5

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales

3 – Médicament

5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement

4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle