

# Association d'hémoglobinoïse D-Punjab et de $\beta$ -thalassémie dans une famille marocaine

## Association of hemoglobinosis D-Punjab and $\beta$ -thalassemia in a Moroccan family

Mohamed Zaïd Saoud<sup>1,2</sup>

Asmâa Biaz<sup>1,2</sup>

Achraf Rachid<sup>1</sup>

Ghizlane El Amin<sup>1,2</sup>

Abdellah Dami<sup>1,2</sup>

Zohra Ouzzif<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Service de biochimie-toxicologie,  
Hôpital militaire d'instruction  
Mohammed V, Rabat, Maroc

<sup>2</sup> Faculté de médecine et de pharmacie,  
Université Mohammed V de Rabat,  
Maroc

**Résumé.** L'hémoglobine D-Punjab est un variant d'hémoglobine fréquent en Inde mais très rare au Maroc. Souvent, sa présence a des répercussions cliniques minimales voire inexistantes. Son association sous forme hétérozygote avec une  $\beta$ -thalassémie est exceptionnelle. Le but de ce travail est de décrire les aspects épidémiologiques, diagnostiques et prophylactiques de l'hémoglobinoïse D-Punjab à partir de l'étude d'une famille. *Matériel et méthodes :* Étude de cas d'hémoglobinoïse D-Punjab dans une famille marocaine, diagnostiqués au service de biochimie-toxicologie de l'Hôpital militaire d'instruction Mohammed V. L'étude biologique a reposé sur l'examen du bilan martial et d'hémolyse, un hémogramme et une étude de l'hémoglobine (électrophorèses en milieux alcalin et acide, chromatographie en phase liquide à haute performance). La patiente index a bénéficié en plus d'un séquençage par biologie moléculaire. *Résultats :* La patiente index était hétérozygote D-Punjab/ $\beta^0$ -thalassémie, confirmée par biologie moléculaire. Deux de ses sœurs présentaient le même profil hémoglobinique. À l'électrophorèse, toutes les trois avaient une hémoglobine D-Punjab supérieure à 90 %, une hémoglobine A inférieure à 1 % et une hémoglobine A<sub>2</sub> supérieure à 6 %. Les résultats des trois hémogrammes présentaient des anomalies similaires (pseudo-polyglobulie, hypochromie, microcytose, anisopoikilocytose). Six autres membres de la famille présentaient un trait thalassémique et trois autres une hémoglobinoïse D-Punjab hétérozygote. *Conclusion :* L'hémoglobinoïse D-Punjab reste extrêmement rare au Maroc et très peu documentée dans la littérature. Le nombre de cas rapportés devrait augmenter du fait des migrations de plus en plus importantes. La prestation de conseils du biologiste requiert de poser un diagnostic précis afin de donner un conseil génétique correct.

**Mots clés :** hémoglobinoïse D-Punjab,  $\beta^0$ -thalassémie, hétérozygotie composite, conseil génétique

**Abstract.** Hemoglobin D-Punjab is a common hemoglobin variant in India but very rare in Morocco. Often, its presence has minimal or no clinical impact. Its heterozygous association with  $\beta$ -thalassemia is exceptional. The purpose of the study is to describe the epidemiological, diagnostic and prophylactic aspects of hemoglobinosis D-Punjab from a family case study. *Material and methods:* Case study of hemoglobinosis D-Punjab in a Moroccan family, diagnosed at the Laboratory of Biochemistry-Toxicology of the Mohammed V Military Teaching Hospital. The biological study was based on iron and hemolysis checkups, hemogram and study of hemoglobin (electrophoresis in alkaline and acid medium, high performance liquid chromatography). The index patient also benefited from sequencing by molecular biology. *Results:* The index patient was heterozygous D-Punjab/ $\beta^0$ -thalassemia, confirmed by molecular biology. Two of her sisters had the same hemoglobin profile. At electrophoresis, all three had

reçu le 07 septembre 2019,  
accepté le 17 janvier 2020

**Correspondance :** M.Z. Saoud  
<zaydie\_3@hotmail.com>

hemoglobin D-Punjab higher than 90%, hemoglobin A less than 1% and hemoglobin A<sub>2</sub> higher than 6%. The results of the three hemograms showed similar abnormalities (pseudo-polycythemia, hypochromia, microcytosis, anisopoikilocytosis). Six other members of the family had a thalassemic trait and another three had heterozygous hemoglobinosis D-Punjab. **Conclusion:** Hemoglobin D-Punjab remains extremely rare in Morocco and very poorly documented in the literature. The number of reported cases is expected to raise due to increasing migration. Biologist advisory services require a precise diagnosis in order to give correct genetic counseling.

**Key words:** hemoglobinosis D-Punjab,  $\beta^0$ -thalassemia, compound heterozygosity, genetic counseling

L'hémoglobine D-Punjab (Hb D-Punjab), également appelée Hb D-Los Angeles, est un variant d'hémoglobine faisant partie des hémoglobines D, les autres variants D recensés dans le Globin Gene Server étant l'Hb D-Agri, l'Hb D-Bushman, l'Hb D-Ouled Rabah, l'Hb D-Iran, l'Hb D-Granada, l'Hb D-Ibadan et l'Hb D-Neath [1, 2]. Malgré des variations nucléotidiques différentes, les hémoglobines D ont en commun un profil électrophorétique identique sur support solide en milieu alcalin.

Environ 7 % de la population mondiale présente des mutations au niveau des gènes codant les chaînes de l'hémoglobine [2]. L'Hb D-Punjab résulte d'une mutation ponctuelle de transversion guanine cytosine au niveau du codon 121 du gène *HBB*, dans le chromosome 11, ce qui provoque une substitution de l'acide glutamique par la glutamine en position 121 de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine : [ $\beta$ 121(GH4) Glu→Gln; *HBB*: c.364G>C] [3].

L'hémoglobinoïse D-Punjab est surtout retrouvée dans la région du Pendjab, dans le Nord-Ouest de l'Inde, ainsi qu'en Iran [4, 5]. Son incidence diminue à mesure que l'on se rapproche du bassin méditerranéen. L'observation de la distribution des populations présentant ce polymorphisme laisse supposer qu'elle est originaire d'Asie centrale [6]. Cependant, l'analyse des différents haplotypes associés à cette mutation, ainsi que leur répartition géographique et leur prévalence, suggère plutôt une origine multicentrique de l'Hb D-Punjab [2]. Ceci est d'autant plus vrai que le site de la mutation est une région palindromique du gène *HBB* où de nombreuses mutations sont décrites, d'où la fréquence élevée de mutations au niveau du codon 121 [7]. Au Maroc, et au Maghreb de façon générale, les deux variants d'hémoglobine les plus communs sont l'Hb S et l'Hb C ; l'Hb D-Punjab y est beaucoup plus rare [8].

Sur support solide, la mobilité électrophorétique de l'Hb D-Punjab est similaire à celle de l'Hb S à pH alcalin. L'absence de falciformation des hématies Hb D-Punjab après adjonction d'un réducteur, tel le métabisulfite de sodium en solution isotonique, permet de différencier les deux variants, ainsi que l'électrophorèse à pH acide, dans

laquelle l'Hb D-Punjab migre dans la même zone que l'Hb A. Cependant, d'autres variants d'hémoglobine ont un comportement électrophorétique similaire, comme l'Hb G et l'Hb Korle-Bu [2].

### Matériel et méthodes

Ce travail est une étude de cas d'hémoglobinoïse D-Punjab dans une famille originaire de la région de Zaër, au Maroc, diagnostiqués et répertoriés de façon transversale au niveau du service de biochimie-toxicologie de l'Hôpital militaire d'instruction Mohammed V.

À partir de la découverte du cas de la patiente index, une enquête familiale a été menée, intéressant le mari, les trois enfants, la fratrie de la patiente et leur descendance. Afin de récolter les données de manière uniforme, nous avons élaboré une fiche d'exploitation où sont colligées les différentes données des patients : épidémiologiques (identité, âge, sexe, ethnie, consanguinité), cliniques (antécédents personnels et familiaux, signes fonctionnels et physiques) et biologiques (hémogramme avec frottis sanguin ; bilan biochimique : protéine C réactive (CRP), ferritine, bilirubine, aspartate aminotransférase (ASAT) et lactate déshydrogénase (LDH) ; étude de l'hémoglobine : électrophorèses de l'hémoglobine en milieux alcalin et acide, chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP ou HPLC)). Pour chaque patient, des prélèvements de sang ont été effectués sur un tube sec pour le bilan biochimique et sur deux tubes éthylène-diamine-tétra-acétate (EDTA), un pour l'hémogramme et un pour l'étude de l'hémoglobine. Un troisième tube EDTA a été prélevé chez la patiente index, qui a bénéficié, après consentement éclairé, d'un séquençage par biologie moléculaire réalisé dans un laboratoire externe.

L'hémogramme a été effectué sur l'automate Coulter LH 750 de Beckman Coulter. Un frottis sanguin mince a ensuite été réalisé.

Le bilan biochimique, réalisé afin d'apprécier l'état de la réserve en fer et de l'hémolyse, a été effectué sur l'automate Dimension RxL de Dade-Behring. Le dosage de l'haptoglobine n'a pu être effectué en raison d'indisponibilité du réactif.

L'électrophorèse de l'hémoglobine en milieu alcalin a été effectuée sur l'automate d'électrophorèse capillaire Capillarys 2 Flex Piercing de Sebia. L'électrophorèse de l'hémoglobine en milieu acide a été effectuée sur l'automate d'électrophorèse sur gel d'agarose Hydrasys 2 Scan de Sebia. La CLHP de l'hémoglobine sur colonne échangeuse de cations a été effectuée sur l'automate Variant II de Bio-Rad.

Le séquençage de l'acide désoxyribonucléique (ADN) de la patiente index a été réalisé dans un laboratoire externe par la méthode de Sanger.

## Résultats

### Patient index

La patiente index, âgée de 40 ans, originaire de la région rurale de Zaër et mère de trois enfants, était suivie pour un syndrome anémique avec asthénie et pâleur cutanéo-muqueuse au service d'hématologie clinique de l'Hôpital militaire d'instruction Mohammed V. Elle n'avait aucun lien de consanguinité avec son mari.

L'hémogramme a objectivé une anémie à 10,2 g/dL avec une microcytose à 58,5 fl, une hypochromie à 18,2 pg et une

pseudo-polyglobulie à  $6,47 \times 10^6$  éléments/ $\mu\text{L}$ . Le frottis sanguin a révélé une anisopoïkilocytose avec présence d'hématies en cible.

Les résultats du bilan biochimique étaient normaux, avec notamment une absence de carence en fer.

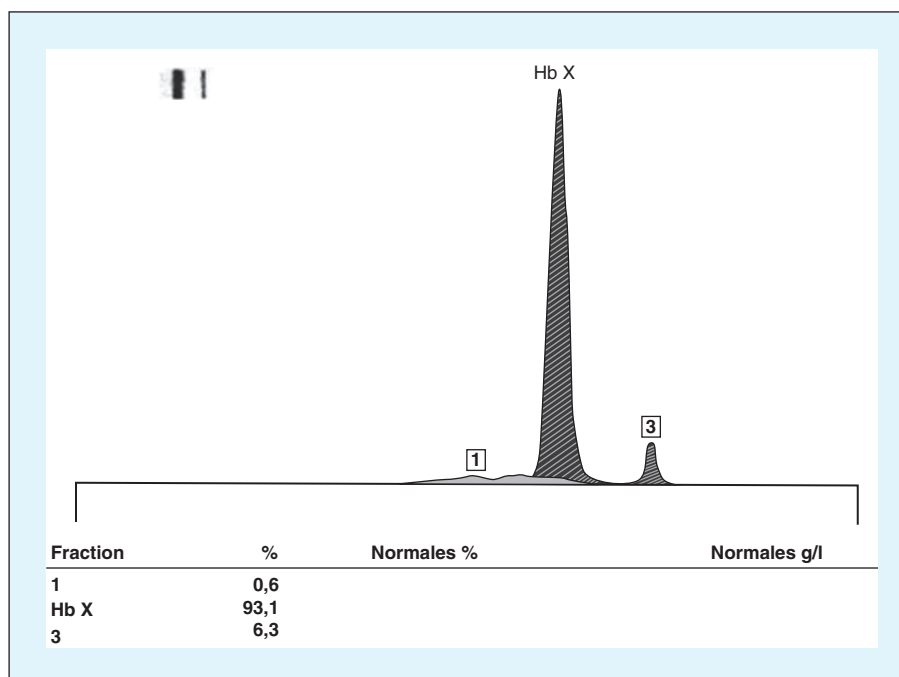
L'électrophorèse capillaire de l'hémoglobine à pH alcalin a révélé la présence d'un variant de l'hémoglobine (hémoglobine X) à 93,1 % migrant entre A (0,6 %) et A<sub>2</sub> (6,3 %) (figure 1).

L'électrophorèse de l'hémoglobine à pH acide a montré que le variant anormal migrerait au même niveau que l'hémoglobine A (figure 2).

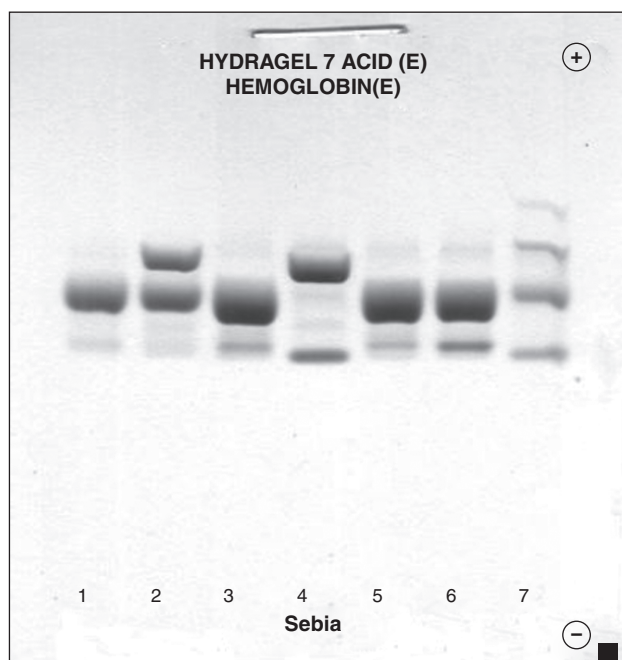
La CLHP a chiffré l'hémoglobine X à 90,2 % et l'hémoglobine A<sub>2</sub> à 9,6 %. Les hémoglobines A et F étaient inférieures à 0,3 %.

Les résultats des électrophorèses et de la CLHP, combinés à ceux de l'hémogramme, étaient évocateurs d'une hétérozygotie composite associant un trait  $\beta$ -thalassémique à un variant de la chaîne  $\beta$  non identifié, autre que les variants S, C ou E. Des investigations complémentaires (étude génétique) ont été entreprises pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Le séquençage de l'ADN a permis de préciser la mutation incriminée : [ $\beta$ 121(GH4) Glu→Gln; *HBB*: c.364G>C]. La patiente index était donc atteinte d'une hétérozygotie de l'hémoglobine associant un trait  $\beta^0$ -thalassémique et une hémoglobine D-Punjab.



**Figure 1.** Profil d'électrophorèse capillaire de l'hémoglobine de la patiente index à pH alcalin (image du laboratoire). 1 : Hb A. 3 : Hb A<sub>2</sub>. La fenêtre de migration du variant observé (Hb X) correspond à celle de l'hémoglobine D-Punjab.



**Figure 2.** Profil électrophorétique de l'hémoglobine de la patiente index (n° 6) sur gel d'agarose en milieu acide (image du laboratoire). 1 : Contrôle normal. 2 et 4 : Autres patients de la série. 3 : Sœur A de la patiente index. 5 : Sœur C de la patiente index. 6 : Patiente index. 7 : Contrôle pathologique (FASC).

## Famille de la patiente index

Une enquête familiale a été menée afin d'étudier l'hémoglobine des autres membres de la famille.

Deux sœurs de la patiente index présentaient également le même syndrome anémique. Elles avaient aussi le même profil hémoglobinique. À l'électrophorèse, toutes les trois avaient une hémoglobine D-Punjab supérieure à 90 %, une hémoglobine A inférieure à 1 % et une hémoglobine A<sub>2</sub> supérieure à 6 %.

Les résultats des trois hémogrammes présentaient des anomalies similaires (pseudo-polyglobulie, hypochromie, microcytose, anisocytose, hématies en cible).

Six descendants de la fratrie de la patiente index présentaient un trait thalassémique (A/ $\beta^0$ -thalassémie) et trois autres une hémoglobinoïse D-Punjab hétérozygote (A/D-Punjab). Ils étaient tous asymptomatiques (*tableau 1* et *figure 3*).

## Discussion

Comme pour toutes les hémoglobinopathies, la mutation responsable de l'Hb D-Punjab est à transmission autosomique récessive. Les états homozygote et hétérozygote sont en général asymptomatiques [9]. Les parents de notre patiente index, qui est hétérozygote D-Punjab/ $\beta^0$ -

thalassémie, sont décédés et nous ne disposons pas de données biologiques les concernant. Nous pouvons seulement supposer qu'un parent a transmis la mutation Hb D-Punjab et l'autre la mutation  $\beta^0$ -thalassémie.

La forme homozygote de l'hémoglobinoïse D-Punjab est très rare et très peu de cas sont décrits. Cette rareté peut s'expliquer par le fait qu'elle est sous-diagnostiquée [10]. En effet, comme la forme hétérozygote, la forme homozygote est généralement asymptomatique [11], mais elle peut aussi se manifester par une anémie hémolytique légère à modérée [2]. La fraction D-Punjab dans ces formes est voisine de 100 %.

La forme hétérozygote de l'hémoglobinoïse D-Punjab est la plus répandue. Elle est en règle asymptomatique, mais une légère anémie peut rarement être objectivée, ainsi que des anomalies morphologiques des hématies au frottis sanguin (anisopoïkilocytose). L'hétérozygotie A/D-Punjab est en général diagnostiquée lors du dépistage de parents asymptomatiques de patients malades, ainsi que lors des dépistages communautaires [9].

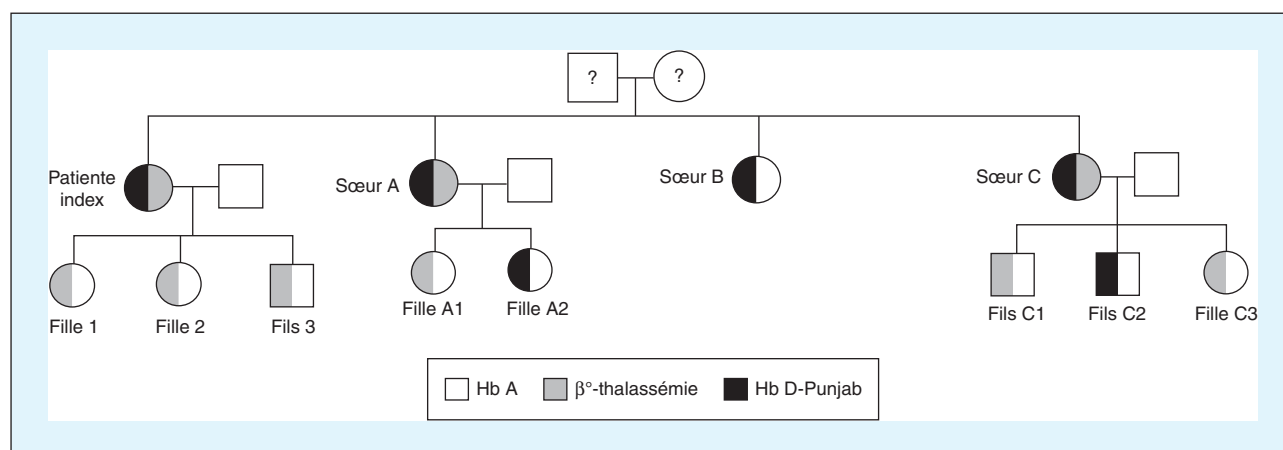
L'hétérozygotie composite D-Punjab/ $\beta^0$ -thalassémie est exceptionnelle [3]. De rares cas familiaux sont rapportés, notamment en Inde [12-14], en Iran [15, 16], en Arabie [11, 17-19], mais aussi en Thaïlande [3], en Europe [20-23] et en Amérique du Nord [24, 25].

L'anémie hémolytique dans ces cas est en règle légère à modérée [3, 13, 25], ce qui est également le cas dans notre étude, mais elle reste plus sévère qu'en cas d'homozygotie D-Punjab [20]. Le frottis sanguin montre une pseudo-polyglobulie, une microcytose et une hypochromie, ainsi qu'une anisocytose constante avec présence d'hématies en cible, ce qui a été retrouvé chez notre patiente ainsi que chez ses sœurs atteintes de cette hétérozygotie composite. Une splénomégalie et une tendance accrue aux infections respiratoires peuvent rarement accompagner l'anémie [11]. Le tableau clinique de notre patiente index se limitait à une simple anémie hémolytique.

Les profils électrophorétiques de l'hétérozygotie composite D-Punjab/ $\beta$ -thalassémie obtenus dans notre étude sont comparables à ceux rapportés par Adekile *et al.* [11], ainsi que par Worthington et Lehmann [20], mais différent sensiblement de ceux rapportés par d'autres études comme celles de Rahimi *et al.* [15], Zakerinia *et al.* [5], Belhoul *et al.* [19] et Das et Mashon [13], notamment en ce qui concerne le pourcentage de la fraction Hb D-Punjab par rapport aux fractions Hb A, Hb A<sub>2</sub> et Hb F. Cependant, ceci peut être expliqué par le polymorphisme des  $\beta$ -thalassémies ( $\beta^0$ -thalassémie ou  $\beta^+$ -thalassémie) et des mutations incriminées, responsables d'une variabilité du pourcentage des différentes fractions, ainsi que par le fait que dans certaines de ces études, il n'est pas précisé s'il s'agit d'hétérozygotie composite D-Punjab/ $\beta$ -thalassémie ou D-Iran/ $\beta$ -thalassémie.

**Tableau 1.** Tableau récapitulatif des résultats biologiques de la patiente index et de sa famille.

	Valeurs de référence	Patiente index	Mari	Fille 1	Fille 2	Fils 3	Sœur A	Fille A1	Fille A2	Sœur B	Sœur C	Fils C1	Fils C2	Fille C3
Âge (années)	-	40	44	14	10	8	54	11	7	47	40	14	10	6
Hématies (10 <sup>6</sup> /μL)	4-5,2	6,47	4,97	6,23	6,6	6,69	7,2	4,84	5,43	4,67	6,47	5,77	5,23	5,49
Hb (g/dL)	12-16	10,2	15,6	12,2	12,7	11,5	13,4	10,2	12,6	12,9	12,7	10,7	12,4	10,5
VGM (fl)	82-98	58,5	92,3	62,6	62,6	55,6	58,5	70,6	73,2	84,9	61,8	61,7	73,3	61,7
TCMH (pg)	27-33	18,2	31,4	19,6	19,2	17,2	18,6	21,1	23,2	27,6	19,6	18,5	23,8	19,2
CRP (mg/L)	0,5-3	2,6	4	4	3	2	2	5	4	3	3	4	6	2
Ferritine (ng/mL)	8-252	22	236	9	35	30	69	33	38	5	31	30	26	22
Bilirubine (mg/L)	0-10	2	7	10	6	8	5	2	3	2	9	8	6	5
Hb A (%)	96,8-97,8	0,6	97	93,8	93,6	94,2	0,7	93,6	60,9	56,7	0,9	93,7	61	93,9
Hb F (%)	≤ 0,5	-	-	0,4	0,6	0,3	1	0,4	0,2	-	-	0,4	-	-
Hb D-Punjab (%)	-	93,1	-	-	-	-	91,8	-	35,7	40	92,9	-	36	-
Hb A <sub>2</sub> (%)	2,2-3,2	6,3	3	5,8	5,8	5,5	6,5	6	3,2	3,3	6,2	5,9	3	6,1
Profil électrophorétique	A/A	D/β <sup>0</sup>	A/A	A/β <sup>0</sup>	A/β <sup>0</sup>	A/β <sup>0</sup>	D/β <sup>0</sup>	A/β <sup>0</sup>	A/D	A/D	D/β <sup>0</sup>	A/β <sup>0</sup>	A/D	A/β <sup>0</sup>

**Figure 3.** Arbre généalogique de la famille de la patiente index.

Les cas d'hétérozygotie composite D-Punjab/ $\beta^+$ -thalassémie sont plus rares. Une étude russe rapporte un cas hétérozygote composite chez un patient atteint du syndrome de Gilbert. La symptomatologie dans ces cas est celle d'une anémie hémolytique avec hypochromie et microcytose [26].

Il existe également des formes composites avec d'autres variants, comme l'hétérozygotie S/D-Punjab, qui est la plus fréquente. L'anémie hémolytique dans ces cas est plus sévère, pouvant aller jusqu'à un syndrome drépanocytaire majeur [4] et des accidents vasculaires cérébraux ischémiques [27]. Deux cas d'hétérozygotie D-Iran/D-Punjab sont rapportés en Inde, donnant un aspect de pic bifide dans la zone D en électrophorèse capillaire [28, 29] (tableau 2). L'étude de l'hémoglobine au laboratoire fait appel à différentes techniques d'exploration phénotypique et, éventuellement, génotypique. La nomenclature des actes de

biologie médicale française stipule que cette étude doit faire appel à au moins une technique d'électrophorèse, associée à deux autres examens adaptés au besoin pour un résultat diagnostique d'orientation. Parmi ces examens, au moins un doit être quantitatif, ce qui est le cas de l'électrophorèse capillaire et de la CLHP. Le compte rendu du résultat doit contenir un commentaire et une conclusion [30].

Les circonstances de l'étude biologique de l'hémoglobine au laboratoire sont nombreuses [31-33] : étude systématique chez un patient originaire d'un pays à risque, notamment les nouveau-nés (dépistage néonatal), les femmes enceintes et lors des bilans préopératoires ; exploration de signes cliniques et hématologiques évocateurs d'une hémoglobinopathie (pâleur, cyanose, ictère, anémie hémolytique, polyglobulie, microcytose, etc.) ; enquête familiale ; découverte fortuite lors du dosage de l'Hb A<sub>1c</sub>.



**Tableau 2.** Tableau synthétique des différentes formes d'hémoglobinoïde D-Punjab et leurs aspects clinico-biologiques.

	Homozygotie Hb D-Punjab	Hétérozygotie Hb D-Punjab	Hétérozygotie composite Hb D-Punjab/ $\beta^0$ -thalassémie
Signes cliniques	Asymptomatique ou syndrome anémique et splénomégalie très discrets	Asymptomatique	Asymptomatique ou syndrome anémique, splénomégalie rare
Hémogramme	Anémie microcytaire, parfois hémolytique	Normal, rarement anisopoikilocytose	Pseudo-polyglobulie, anémie hypochrome microcytaire avec anisocytose
Hb A (%)	Quasi absente	50-70	< 1 (D-Punjab/ $\beta^0$ -thalassémie) ou < 40 (D-Punjab/ $\beta^+$ -thalassémie)
Hb D-Punjab (%)	> 95	30-40	> 90 (D-Punjab/ $\beta^0$ -thalassémie) ou > 70 (D-Punjab/ $\beta^+$ -thalassémie)
Hb A <sub>2</sub> (%)	Normale	Normale	Augmentée
Profil hémoglobinique	D-Punjab/D-Punjab	A/D-Punjab	D-Punjab/ $\beta^0$ -thalassémie ou D-Punjab/ $\beta^+$ -thalassémie

La prescription doit contenir des renseignements cliniques précis et pertinents, incluant notamment l'origine ethnique du patient, la notion de consanguinité des parents, les antécédents familiaux d'hémoglobinopathie et les éventuels signes cliniques. Le statut transfusionnel doit impérativement être mentionné. Toute transfusion sanguine datant de moins de trois mois peut en effet fausser le résultat de l'examen et le rendre ininterprétable [31-33].

Un hémogramme récent doit être disponible avec, idéalement, le taux de réticulocytes. Le frottis sanguin permet, en outre, d'étudier la morphologie des hématies. Le bilan martial est également nécessaire pour l'interprétation du taux de certaines fractions comme l'Hb A<sub>2</sub> [31, 33] (figure 4).

En cas d'hémoglobinoïde D-Punjab, sur CLHP, le taux d'Hb A<sub>2</sub> est très variable, pouvant être inférieur à 3,5 % et dépasser 6 % dans une même fratrie [13]. Cette hétérogénéité, retrouvée dans notre étude, suggère que les taux d'Hb A<sub>2</sub> mesurés sur CLHP, outil diagnostique pour le trait  $\beta$ -thalassémique, ne sont pas fiables dans la différenciation des homozygotes D-Punjab des hétérozygotes composites D-Punjab/ $\beta^0$ -thalassémie. Sur CLHP, l'Hb D-Punjab éluée près de l'Hb A<sub>2</sub>, le taux de cette dernière étant par conséquent sous-estimé fréquemment. Sur électrophorèse capillaire, les variants d'hémoglobine les plus fréquents (S, C, D-Punjab, E) migrent séparément de l'hémoglobine A<sub>2</sub> et n'interfèrent donc pas dans sa quantification. Ainsi, l'électrophorèse capillaire est très efficace dans la séparation et la quantification de l'Hb A<sub>2</sub> et est une méthode fiable pour différencier les homozygotes D-Punjab des hétérozygotes composites D-Punjab/ $\beta^0$ -thalassémie [3]. Cependant, dans notre étude, les taux d'Hb A<sub>2</sub> obtenus sur CLHP sont supérieurs à ceux obtenus sur électrophorèse capillaire, ce qui n'est pas retrouvé dans la littérature [13]. Ceci pourrait être expliqué par les divergences entre les différents systèmes d'éluion, ainsi qu'entre les différents types de colonnes de CLHP.

Même si les différentes techniques électrophorétiques et chromatographiques visent à diagnostiquer les hémoglobinopathies, elles restent parfois insuffisantes. Seuls les Hb S, C et E peuvent être formellement identifiées phénotypiquement par les techniques précédentes dans des laboratoires non spécialisés. La présence d'une bande migrant à pH alcalin dans la zone de l'Hb S peut aussi être une Hb D-Punjab, Hb G ou Hb Lepore. L'électrophorèse à pH acide permet de différencier l'Hb S de ces fractions, mais elle ne différencie pas l'Hb D-Punjab de l'Hb G, l'Hb Korle-Bu et l'Hb Lepore [31]. Seule une analyse génotypique permet de les différencier [2], ce qui est reflété dans notre étude, dans laquelle les différentes techniques d'électrophorèse ont permis la quantification de cette fraction, sans pour autant pouvoir l'identifier avec exactitude, ce qui a nécessité la réalisation d'un génotypage. L'exploration génotypique permet ainsi un diagnostic de certitude. Elle recherche une mutation ponctuelle de transversion guanine cytosine au niveau du codon 121 du gène *HBB* dans le chromosome 11 : [ $\beta$ 121(GH4) Glu→Gln; *HBB*: c.364G>C] [2, 3]. La recherche de cette mutation par PCR a permis de poser le diagnostic chez notre patiente index.

Parmi les différents pièges auxquels peut être confronté le biologiste médical dans l'interprétation d'un résultat d'hémoglobinoïde D-Punjab, et dans les hémoglobinopathies en général, figurent les problèmes organisationnels comme l'incapacité d'obtenir des informations sur l'origine ethnique, les antécédents familiaux et tout renseignement clinique indispensable à l'interprétation des résultats, tels le statut transfusionnel ou le bilan martial du patient, ou encore l'impossibilité d'obtenir le consentement éclairé du patient en vue de réaliser une étude génotypique [32]. Nous n'avons pas eu de problème organisationnel dans notre étude, mais ces pièges doivent toujours être pris en compte. C'est aussi le cas pour les laboratoires réalisant le génotypage, qui sont souvent des laboratoires de référence externes. Il est impor-

tant qu'ils aient des informations pertinentes sur le patient leur permettant de réaliser les examens appropriés [32].

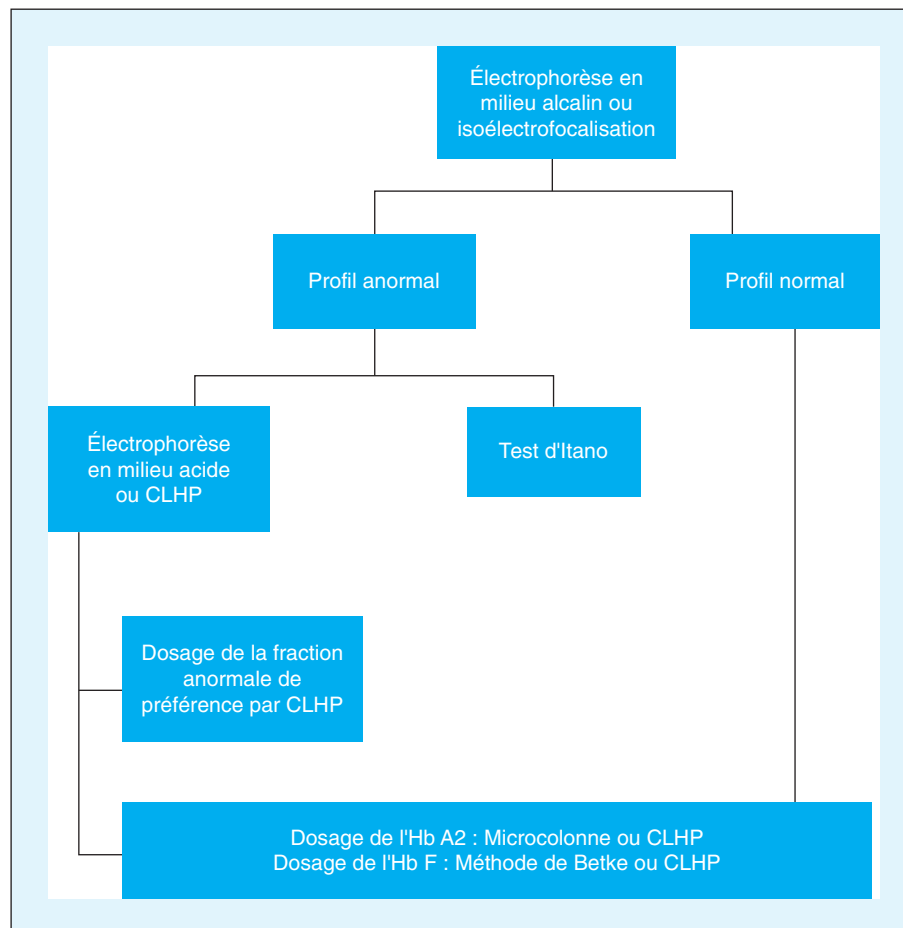
Les résultats de la CLHP doivent toujours être évalués en prenant en compte le taux d'hémoglobine et d'hématies à l'hémoграмme afin de faire la distinction entre une homozygotie d'un variant d'hémoglobine comme l'Hb D-Punjab et une hétérozygotie composite avec une  $\beta^0$ -thalassémie, comme c'est le cas dans notre étude concernant la patiente index et deux de ses sœurs [32].

La prestation de conseils du biologiste médical envers les staffs des cliniciens joue également un rôle important. Une erreur d'interprétation des résultats par le clinicien peut être due à une expérience et des connaissances inadaptées à un champ très complexe et spécialisé. Il convient alors de maintenir une veille scientifique, de mettre à jour en permanence ses connaissances et de demander l'avis d'un expert si nécessaire [32].

D'après les résultats de notre étude, six patients sont porteurs d'un trait  $\beta$ -thalassémique, trois sont hétérozygotes A/D-Punjab et trois sont hétérozygotes composites D-Punjab/ $\beta^0$ -thalassémie. Ceci indique l'intérêt du conseil

généétique, qui peut être subdivisé en deux parties : le diagnostic avec estimation des risques et une deuxième partie, plus complexe, de conseil en fonction du diagnostic. Étant donné que les hémoglobinopathies sont à transmission autosomique récessive, le but ultime du dépistage d'hétérozygotes porteurs sains est non pas d'identifier des porteurs sains isolés, mais des couples dont les deux membres sont porteurs et qui présentent donc un risque sur quatre à chaque grossesse de donner naissance à un enfant malade, afin de leur proposer un conseil génétique [31].

En plus de la forme homozygote, dont la symptomatologie reste bénigne, le grand risque de l'hémoglobinose D-Punjab est son hétérozygotie composite avec une autre hémoglobinopathie, notamment l'hémoglobinose S, ce qui peut être responsable de syndromes drépanocytaires majeurs. En Occident, des programmes de dépistage systématique par analyse du phénotype pendant la grossesse et à la naissance ont été mis en place pour les sujets à risque. La détection précoce des patients S/D-Punjab permet leur prise en charge dès le plus jeune âge par des équipes spécialisées [31].



**Figure 4.** Stratégie à adopter pour la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine [33].

## Conclusion

L'hémoglobinoses D-Punjab reste extrêmement rare au Maghreb et très peu documentée dans la littérature. Cependant, le nombre de cas rapportés devrait augmenter dans les futures années du fait des migrations humaines de plus en plus importantes. En outre, cette étude souligne la difficulté du diagnostic de cette hémoglobinopathie, qui fait appel à une panoplie d'examen, dont une exploration phénotypique basée sur des techniques électrophorétiques et chromatographiques, ainsi qu'une exploration génotypique. La prestation de conseils du biologiste médical requiert de poser un diagnostic précis afin de donner un conseil génétique correct et adéquat dans la prévention de cette hémoglobinopathie. Une stratégie de dépistage des hémoglobinopathies en général devrait être instaurée à l'échelle nationale afin de disposer de données épidémiologiques marocaines et de mieux prendre en charge les patients et les couples porteurs sains.

**Liens d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

## Références

1. Patrinos GP, Giardine B, Riemer C, Miller W, Chui DH, Anagnou NP, et al. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. *Nucleic Acids Res* 2004 ; 32 : D537-41.
2. Torres Lde S, Okumura JV, Silva DG, Bonini-Domingos CR. Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015 ; 37 : 120-6.
3. Panyasai S, Rahad S, Pornprasert S. Coinheritance of hemoglobin D-Punjab and  $\beta^0$ -thalassemia 3.4 kb deletion in a Thai girl. *Asian J Transfus Sci* 2017 ; 11 : 199-202.
4. Rahimah A, Syahira Lazira O, Siti Hida HM, Faidatul Syazlin AH, Nur Aisyah A, Nik Hafidzah NM, et al. Haemoglobin sickle d punjab: a case report. *Med J Malaysia* 2014 ; 69 : 42-3.
5. Zakerinia M, Ayatollahi M, Rastegar M, Amanat SH, Askarinejad AR, Amirghofran S, et al. Hemoglobin D (Hb D Punjab/Los Angeles and Hb D Iran) and co-inheritance with alpha- and beta-thalassemia in southern Iran. *Iran Red Crescent Med J* 2011 ; 13 : 493-8.
6. Atalay EO, Atalay A, Üstel E, Yıldız S, Öztürk O, Kösele A, et al. Genetic origin of Hb D-Los Angeles [ $\beta$ 121(GH4)Glu→Gln, GAA→CAA] according to the  $\beta$ -globin gene cluster haplotypes. *Hemoglobin* 2007 ; 31 : 387-91.
7. Yavarian M, Karimi M, Paran F, Neven C, Harteveld CL, Giordano PC. Multi centric origin of Hb D-Punjab [ $\beta$ 121(GH4)Glu→Gln, GAA→CAA]. *Hemoglobin* 2009 ; 33 : 399-405.
8. Chami B, Blouquit Y, Bardakdjian-Michau J, Riou J, Wajcman H, Rosa J, et al. Hemoglobin variants in North Africa. *Hemoglobin* 1994 ; 18 : 39-51.
9. Srinivas U, Pati HP, Saxena R. Hemoglobin D-Punjab syndromes in India: a single center experience on cation-exchange high performance liquid chromatography. *Hematology* 2010 ; 15 : 178-81.
10. Silva-Pinto AC, Silva TJ, Moretto EL, Ottoboni MÂ EL, Rodrigues ES, Covas DT. Blood donor homozygous for Hb D Los Angeles. *Transfus Apher Sci* 2014 ; 51 : 219-20.
11. Adekile AD, Kazanetz EG, Leonova JY, Marouf R, Khmis A, Huisman TH. Co-inheritance of Hb D-Punjab (codon 121; GAA→CAA) and beta (0)-thalassemia (IVS-II-1;G→A). *J Pediatr Hematol Oncol* 1996 ; 18 : 151-3.
12. Pandey S, Ranjan R, Mishra RM, Pandey S, Saxena R. Interaction of -  $\alpha$  3.7,  $\beta$  thalassemia mutation IVS 1-5 and HbD Punjab in a family: a case report. *Indian J Clin Biochem* 2012 ; 27 : 314-7.
13. Das S, Mashon RS. Coinheritance of Hb D-Punjab and  $\beta$ -thalassemia: diagnosis and implications in prenatal diagnosis. *Hemoglobin* 2015 ; 39 : 138-40.
14. Shekhdia KM, Leuva AC, Mannari JG, Ponda AV, Amin A. Co-inheritance of haemoglobin D-Punjab and beta thalassemia – a rare variant. *J Clin Diagn Res* 2017 ; 11 : OD21-2.
15. Rahimi Z, Akramipour R, Korani S, Nagel RL. Hb D-Punjab [ $\beta$  121 (GH4) Glu→Gln]/ $\beta^0$ -thalassemia [IVSII.1(G→A)] in two cases from an Iranian family: first report. *Am J Hematol* 2006 ; 81 : 302-3.
16. Keikhaei B, Galehdari H, Salehi B. Co-inheritance  $\alpha\alpha\alpha$  anti 3.7 triplification with hemoglobin D/ $\beta^0$  thalassemia: a case report from South west of Iran. *J Med Genet Genom* 2010 ; 2 : 18-23.
17. Ahmed M, Stuhmann M, Bashawri L, Kühnau W, El-Harith EH. The beta-globin genotype E121Q/W15X (cd121GAA→CAA/cd15TGG→TGA) underlines Hb d/beta-(0) thalassaemia marked by domination of haemoglobin D. *Ann Hematol* 2001 ; 80 : 629-33.
18. Owaidah TM, Al-Saleh MM, Al-Hellani AM. Hemoglobin D/beta-thalassemia and beta-thalassemia major in a Saudi family. *Saudi Med J* 2005 ; 26 : 674-7.
19. Belhoul KM, Bakir ML, Abdulrahman M. Misdiagnosis of Hb D-Punjab/ $\beta$ -thalassemia is a potential pitfall in hemoglobinopathy screening programs: a case report. *Hemoglobin* 2013 ; 37 : 119-23.
20. Worthington S, Lehmann H. The first observation of Hb D Punjab  $\beta^0$  thalassaemia in an English family with 22 cases of unsuspected  $\beta^0$  thalassaemia minor among its members. *J Med Genet* 1985 ; 22 : 377-81.
21. Ropero P, González FA, Sánchez J, Armada B, Martí E, Valdés B, et al. Asociación de  $\beta^0$ -talasemia y Hb D-Punjab en una familia de origen hindú : segundo caso descrito en España. *Med Clin (Barc)* 1997 ; 108 : 385-8.
22. Troitskaia OV, Antonova LA, Lozhechnik IG, Toshchan OV. Beta-thalassemia and Hb D in patients with anemia. *Klin Lab Diagn* 1998 ; 3 : 16-23.
23. Theodoridou S, Alemayechou M, Perperidou P, Sinopoulou C, Karafoulidou T, Kiriakopoulou G. Compound heterozygosity for Hb D-Punjab/ $\beta$ -thalassemia and blood donation: case report. *Turk J Haematol* 2009 ; 26 : 100-1.
24. Wong SC, Ali MA. Haemoglobin D Los Angeles, D- $\beta^+$ -thalassaemia, and D- $\beta^0$ -thalassaemia. A report of two Canadian families. *Acta Haematol* 1980 ; 63 : 151-5.



25. Perea FJ, Casas-Castañeda M, Villalobos-Arámula AR, Barajas H, Alvarez F, Camacho A, *et al.* Hb D-Los Angeles associated with Hb S or beta-thalassemia in four Mexican Mestizo families. *Hemoglobin* 1999 ; 23 : 231-7.
26. Petrenko AA, Pivnik AV, Kim PP, Demidova EY, Surin VL, Abdullaev AO, *et al.* Coinheritance of HbD-Punjab/ $\beta$ +--thalassemia (IVSI+5 G-C) in patient with Gilbert's syndrome. *Ter Arkh* 2018 ; 90 : 105-9.
27. Afzal H, Umair SF. Haemoglobin sickle D disease: a presentation with ischaemic stroke. *J Pak Med Assoc* 2016 ; 66 : 348-50.
28. Gupta A, Saraf A, Dass J, Mehta M, Radhakrishnan N, Saxena R, *et al.* Compound heterozygous hemoglobin D-Punjab/hemoglobin D-Iran: a novel hemoglobinopathy. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2014 ; 30(Suppl 1) : 409-12.
29. Tripathi P, Gupta A, Tyagi S. Compound heterozygote of Hb D-Punjab and Hb D-Iran; an interesting finding. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2019 ; 35 : 172-3.
30. Caisse nationale de l'assurance maladie des travailleurs salariés. Biologie médicale Nomenclature des actes. Document de travail. DPROD/Dr FS/DbelK/NA V53. 2019.
31. Siguret V, Andreux JP. Diagnostic biologique des hémoglobinopathies par analyse du phénotype. *Ann Biol Clin (Paris)* 1997 ; 55 : 103-12.
32. Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. *Blood Rev* 2011 ; 25 : 205-13.
33. Bardakdjian-Michau J, Dhondt JL, Ducrocq R, Galactéros F, Guyard A, Huchet FX, *et al.* Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. *Ann Biol Clin (Paris)* 2003 ; 61 : 401-9. Erratum in: *Ann Biol Clin (Paris)* 2003 ; 61 : 588.