

Hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies correspondent aux anomalies qui touchent la partie protéique de l'hémoglobine (Hb). Affections héréditaires, ce sont les maladies monogéniques les plus répandues dans le monde. On estime à 7 % de la population mondiale le nombre de sujets porteurs hétérozygotes. Ces pathologies, endémiques dans certaines populations, sont de plus en plus fréquemment observées en Europe du Nord du fait des mouvements de population.

Les sujets hétérozygotes sont généralement asymptomatiques, mais les sujets homozygotes ou hétérozygotes composites sont exposés à des complications sévères, voire mortelles. La prévention des hémoglobinopathies passe par le dépistage des porteurs asymptomatiques. En France, la drépanocytose fait l'objet d'un dépistage systématique dans les populations à risque depuis 1995.

Malgré la très grande diversité des anomalies en cause sur le plan moléculaire, le diagnostic est généralement porté sur le seul phénotype. L'utilisation d'une combinaison de techniques fiables et suffisamment précises permet d'en faire le diagnostic dans la grande majorité des cas. L'interprétation des résultats nécessite de connaître le contexte clinique et transfusionnel éventuel, le contexte biologique (hémogramme, bilan martial, bilan d'hémolyse) ainsi que le contexte ethnique et familial du patient.

ASPECTS FONDAMENTAUX

Les notions fondamentales sur la structure, la synthèse et le fonctionnement de la molécule d'Hb permettent de comprendre la physiopathologie des hémoglobinopathies.

Structure de la molécule d'Hb

La molécule d'Hb est une protéine tétramérique constituée de 4 sous-unités de globine semblables deux à deux. Les chaînes de globine appartiennent, pour les unes, à la famille α et pour les autres, à la famille β . Chaque globine a une structure globulaire compacte ménageant une poche dans laquelle vient se nicher une molécule d'hème. Il s'agit d'une protoporphyrine maintenant en son centre un atome de fer sous forme réduite (Fe^{++}) qui permet de fixer l'oxygène.

La fonction principale de l'Hb est de transporter l'oxygène des poumons vers les tissus et de faciliter l'élimination du CO_2 . La structure de la molécule d'Hb se modifie au cours de la fixation et de la libération de

l'oxygène grâce à son caractère allostérique : la fixation d'une molécule d'oxygène favorise la fixation de molécules additionnelles. Les contacts entre les différentes sous-unités de globine sont essentiels pour maintenir la stabilité de la molécule et garantir le caractère coopératif de la fonction oxyphorique.

L'affinité pour l'oxygène varie en fonction du pH, de la température, de la teneur en CO_2 et d'anions comme le 2,3 diphosphoglycérate (2,3-DPG) dont la fixation au centre de la molécule d'Hb diminue considérablement l'affinité de celle-ci pour l'oxygène.

Gènes de l'Hb

Les chaînes de type α correspondent à des chaînes polypeptidiques de 141 résidus dont la synthèse est sous le contrôle de gènes situés sur le chromosome 16. Les chaînes de type β (auxquelles se rattachent les chaînes γ , δ et ϵ) comportent 146 résidus et dépendent de gènes situés sur le chromosome 11.

L'organisation des familles des gènes α et β -globine est présentée schématiquement dans la figure 2. Le contrôle de leur expression s'exerce à plusieurs niveaux :

- spécificité tissulaire stricte (lignée érythrocytaire) ;
- expression, au cours du développement, dans l'ordre de leur position topographique. On observe des commutations successives « switch » qui modifient la composition de l'Hb ;
- expression coordonnée précisément qui aboutit à une synthèse équivalente des gènes de la famille α et de la famille β , tout déséquilibre se traduisant par un syndrome thalassémique.

Différents types Hb humaines

Différentes Hb se succèdent et se chevauchent au cours des étapes de la vie ; il en existe toujours plusieurs simultanément. Elles se distinguent par la nature des chaînes qui les constituent. La figure 3 représente la succession de ces diverses sous-unités au cours de l'évolution ontogénique. La proportion relative des diverses Hb évolue parallèlement au changement du lieu de l'érythropoïèse : sac vitellin chez l'embryon, foie, rate et moelle osseuse chez le fœtus, moelle osseuse chez l'adulte normal.

- Pendant les 3 premiers mois de la gestation, les globules rouges contiennent des Hb embryonnaires.
- Chez le fœtus, à partir du 37^e jour, l'Hb fœtale HbF ($\alpha_2\gamma_2$) apparaît pour devenir le composant hémoglobinique principal. Sa proportion atteint 90 % entre la 8^e et la 10^e semaine. L'HbF a une affinité intrinsèque pour l'oxygène identique à l'HbA de l'adulte, mais ses liaisons au 2,3-DPG sont beaucoup

Figure 2. Structure et organisation schématique des deux familles de gènes globine. Les gènes sont organisés de 5' en 3' selon leur ordre d'expression au cours du développement

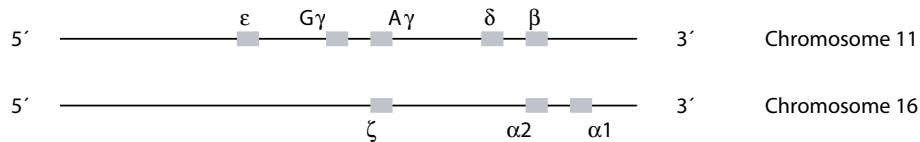
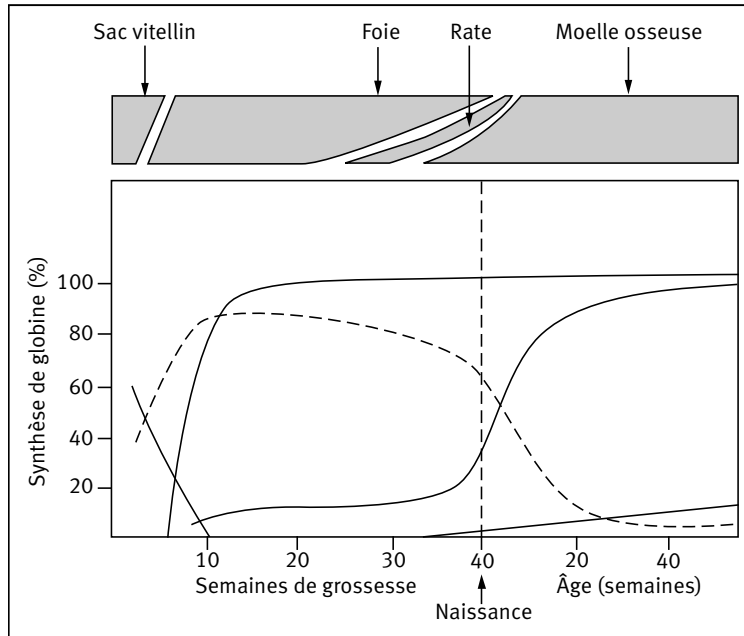


Figure 3. Expression des gènes de globine au cours du développement ontogénique



D'après : Bain BJ. – Haemoglobinopathy diagnosis. – 2nd edition. – Oxford : Blackwell Publishing, 2006 ; p. 2.

plus faibles. Ainsi, les hématies fœtales ont une affinité pour l'oxygène sensiblement supérieure à celle des hématies maternelles, ce qui favorise le transport d'oxygène de la mère vers le fœtus. Peu avant la naissance, entre la 32^e et la 36^e semaine de gestation, l'HbF commence à décliner au profit de l'HbA ($\alpha_2\beta_2$). À la naissance, le pourcentage d'HbA est de 15 à 30 %.

- Chez l'adulte, le profil caractéristique s'observe à partir de l'âge de 6 mois. Le switch $\gamma\beta$ est effectué à 90 % à 6 mois, et à 95 % à 1 an. Il est terminé vers 5–6 ans. L'HbA représente plus de 95 % de la totalité des Hb. Il existe un constituant mineur, l'HbA₂, dont la synthèse débute pendant la période néonatale et qui est exprimée à un taux d'environ 2,5 %. L'HbF ne subsiste plus qu'à l'état de traces (< 1 %) et reste limitée à une population restreinte, les cellules « F ». Ces dernières, dont le nombre est génétiquement déterminé, représentent 1 à 7 % de l'ensemble des érythrocytes, et correspondraient à des hématies dont la

différenciation est différente de celles des cellules ne synthétisant que de l'HbA.

La figure 4 résume sous forme de diagramme la proportion relative des diverses Hb chez le fœtus et l'enfant.

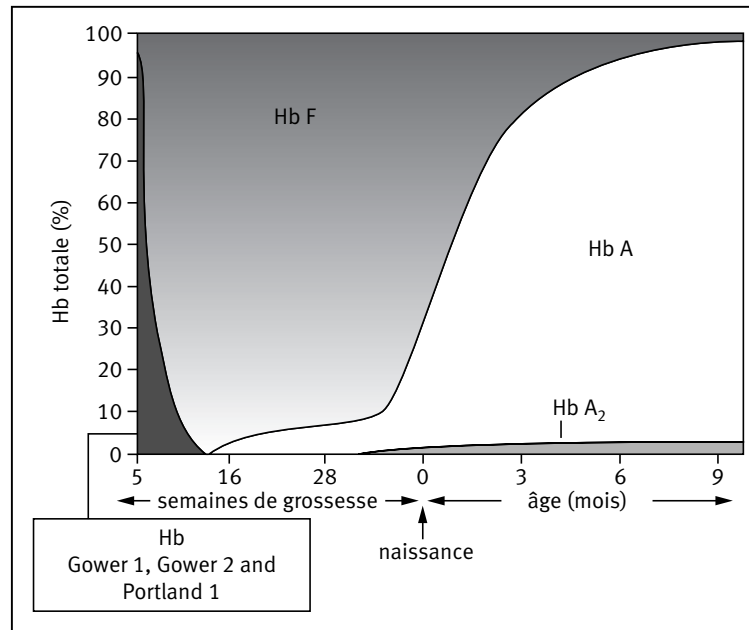
LES HÉMOGLOBINOPATHIES

Les hémoglobinopathies se subdivisent en deux groupes :

- le premier correspond à la présence d'une Hb de structure anormale, entraînant ou non des signes fonctionnels ;
- le second à un défaut de synthèse, partiel ou total, qui s'exprime dans le groupe très hétérogène des thalassémies.

Ce sont des pathologies différentes dans leur expression clinique et leur physiopathologie. Néanmoins, il existe en réalité un certain chevauchement entre ces deux

Figure 4. Proportions des différentes Hb chez le fœtus et l'enfant



D'après : Bain BJ. – Haemoglobinopathy diagnosis. – 2nd edition. – Oxford : Blackwell Publishing, 2006 ; p. 3.

groupes, puisque certaines Hb de structure anormale se comportent comme des mutants thalassémiques.

Hb anormales

Plus de 1 000 variants sont aujourd'hui répertoriés dans la banque de données HbVar accessible sur le Web (<http://globin.cse.edu/globin/hbvar/menu.html>). Seuls un tiers d'entre eux ont des répercussions cliniques, la mutation intervenant dans une zone critique pour le fonctionnement de la molécule. Trois Hb anormales occupent une place prépondérante de par leur fréquence et leur caractère pathogène : HbS, HbE et HbC.

Les Hb anormales peuvent être classées en 4 groupes :

- les mutants qui sont à l'origine de problèmes de santé publique majeurs. Il s'agit surtout des HbS dans la population africaine et des HbE dans les populations du Sud-Est asiatique ;
- les variants plus rares, mais présents dans les populations où l'HbS a une forte prévalence. C'est le cas des HbC, O-Arab et D-Punjab, qui par elles-mêmes n'ont qu'un effet pathogène minime, mais qui, associées à l'HbS, conduisent à des syndromes drépanocytaires majeurs ;
- les variants rares, à l'origine de troubles hémato-logiques variés : Hb instables (qui sont la cause d'anémies hémolytiques chroniques), Hb hyperaffines (responsables de polyglobulies), Hb hypoaffines (res-

ponsables d'anémies avec cyanose), HbM (cause de méthémoglobinémies) ;

- les polymorphismes ou les mutations privées, habituellement totalement silencieux sur le plan clinique. Ils ont été découverts lors d'études systématiques de population ou parce qu'ils interfèrent avec le dosage de l'Hb glyquée. Ces mutants doivent être caractérisés et rapportés dans les banques de données pour éviter qu'ils ne soient confondus avec des mutants aux conséquences cliniques sévères.

– HbS

L'HbS est un mutant de la chaîne β , où l'acide glutamique en position 6 est remplacé par une valine.

- Répartition géographique

Il est fréquent chez les sujets originaire d'Afrique noire (jusqu'à 25 % de la population dans certaines régions) et également retrouvé aux Antilles (10–12 %), au Maghreb, en Sicile, en Grèce, dans tout le Moyen-Orient et aux Indes. Il définit la drépanocytose, maladie génétique à transmission autosomique récessive.

- Diagnostic biologique

L'HbS présente une charge différente de l'HbA ; elle est mise en évidence par des techniques électrophorétiques et/ou chromatographiques, un seul test n'étant pas suffisant pour affirmer son existence. Il peut être nécessaire de confirmer sa présence par des tests

fonctionnels. Le dosage précis des différentes fractions est indispensable pour affiner le diagnostic. Le taux d'HbA₂ mesuré par chromatographie liquide haute performance (CLHP) peut être légèrement augmenté chez un porteur d'HbS en raison de la présence de dérivés de l'HbS pouvant coéluer avec l'HbA₂.

- Forme asymptomatique

La forme hétérozygote (HbA/HbS) est habituellement cliniquement muette, l'hémogramme est normal et seule l'étude de l'Hb est capable de la mettre en évidence. Les chaînes α s'associent préférentiellement aux chaînes β normales, le taux d'HbS chez un sujet A/S se situe autour de 40 %.

Une microcytose, en l'absence de carence martiale, doit faire suspecter l'association avec une α -thalassémie. En effet, l' α -thalassémie est fréquente dans les populations africaines et se retrouve donc souvent chez les porteurs du gène HbS. Dans ce cas, le taux d'HbS est inférieur à celui d'un sujet A/S. En cas d'un seul gène α délété, le taux d'HbS se situe entre 30 et 35 % ; en cas de deux gènes α délétés, il tombe à 25–30 %.

Chez un hétérozygote symptomatique, une étude complémentaire est parfois nécessaire pour mettre en évidence une mutation supplémentaire sur les gènes β ou α , en *cis* ou en *trans*. L'HbS-Antilles, pour laquelle une seconde mutation (β 23 Val→Ile) sur le gène de l'HbS favorise la polymérisation, est facilement identifiable par CLHP.

- Syndrome drépanocytaire majeur

Le terme de « syndrome drépanocytaire majeur » est utilisé pour désigner les formes cliniques graves et peut correspondre à différentes formes génétiques : forme homozygote (HbS/HbS) ou hétérozygoties composites associant l'HbS à une β -thalassémie ou à une autre Hb anormale (HbC le plus souvent en France, Hb-D-Punjab ou Hb-O-Arab). Chez ces patients, l'HbS polymérise, lors de la désoxygénation, en longues fibres entraînant rigidification et déformation de l'hématie à l'origine des deux manifestations principales : l'anémie hémolytique chronique et les accidents vaso-occlusifs. Ces patients doivent bénéficier d'une prise en charge précoce dans des centres spécialisés. Le taux de mortalité reste élevé en Afrique noire.

Le taux d'HbF est variable et doit être déterminé avec précision, car il est admis que, dès qu'il dépasse 10 %, il suffit à inhiber partiellement la polymérisation et à retarder la falciformation. La CLHP sur colonne échangeuse de cations est la méthode de choix pour quantifier l'HbF.

Les patients qui présentent une persistance héréditaire de l'HbF (PHHF) associée sont généralement asymptomatiques.

L'existence d'une α -thalassémie associée doit également être recherchée, car elle semble associée à certaines complications. Elle peut être suspectée sur des arguments indirects (constantes hématologiques, taux d'HbS, présence d'Hb Bart's ou d'HbH) ou recherchée spécifiquement par des techniques de biologie moléculaire.

L'étude familiale et génotypique est parfois indispensable pour interpréter le phénotype (par exemple pour différencier les patients S/S des patients S/ β^0 -thalassémiques).

Les polymorphismes du locus β -globine définissent 5 types d'haplotypes majeurs associés à l'HbS. Ils sont liés à des variations des taux d'Hb et d'HbF et constitueraient une valeur pronostique pour certains.

Le tableau 8 présente les caractéristiques biologiques des principaux syndromes drépanocytaires.

– HbC

L'HbC est un mutant de la chaîne β où l'acide glutamique en position 6 est remplacé par une lysine.

- Répartition géographique

C'est un variant caractéristique de l'Afrique de l'Ouest (20 %), présent également aux Antilles (3 %).

- Diagnostic biologique

L'HbC migre avec l'HbE lors de l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin, mais s'en distingue légèrement par focalisation isoélectrique et très clairement par CLHP d'échange d'ions.

- Tableaux clinique et biologique

Les sujets hétérozygotes sont cliniquement asymptomatiques. L'hémogramme est normal, parfois discrètement microcytaire.

Les sujets homozygotes présentent une anémie hémolytique chronique modérée. Les frottis sanguins montrent de nombreuses cellules cibles et parfois quelques microsphérocytes. C'est la cristallisation de l'HbC qui est à l'origine d'une déshydratation cellulaire et d'une moindre déformabilité des hématies. Cette déshydratation est responsable d'une concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) élevée (environ 38 g/dl) et d'une microcytose (VGM moyen de 72 fl).

Tableau 8. Caractéristiques biologiques des syndromes drépanocytaires

	Hb (g/dl)	VGM (fl)	réticulocytes	Morphologie érythrocytaire	Étude de l'Hb			
					HbA (%)	HbS (%)	HbF (%)	HbA ₂ (%)
AS	N	N*	N	N	60–65	35–40*	< 1	v
SS	6–10	N*	↑	Drépanocytes (+ à +++) Cellules cibles (+) Corps de Jolly (±)	0	80-95	5–20	v
SC	10–12	↓ (70–90)	↑	Drépanocytes (rares) Cellules cibles (50 %) Poïkilocytose	0	50 (HbC = 45)	1–7	v
S/β ⁺ -thalassémie	9–12	↓ (65–95)	↑	Drépanocytes (rares) Cellules cibles (+ à ++) Microcytes (+ à ++) Poïkilocytose	1–25	55–90	5–15	v
S/β ⁰ -thalassémie	7–11	↓ (60–80)	↑	Drépanocytes (+) Cellules cibles (+ à ++) Microcytes (+ à ++) Poïkilocytose	0	80–90	5–15	v
S/PHHF	N	N*	N	Cellules cibles (±) Microcytes (±)	0	≥ 70	15–35	v

VGM : volume globulaire moyen ; N : normal.

* : valeur abaissée en cas d'α-thalassémie associée.

v : variable car le dosage de l'HbA₂ est ininterprétable en raison d'une contamination par de l'HbS.

D'après : Girot R. – La drépanocytose. – Montrouge : John Libbey Eurotext, 2003 ; p. 16.

C'est l'association HbS/HbC qui est grave, puisqu'elle conduit à un syndrome drépanocytaire majeur. La présence d'HbC doit donc être prise en compte dans le conseil génétique de la drépanocytose. Les couples risquant d'avoir un enfant avec une hémoglobinopathie SC doivent être informés du risque de syndrome drépanocytaire majeur.

– HbE

L'HbE est un mutant de la chaîne β où l'acide glutamique en position 26 est remplacé par une lysine. C'est sans doute la plus fréquente des Hb anormales.

L'HbE a des propriétés fonctionnelles peu différentes de l'HbA. Cependant, elle constitue un modèle particulier de β⁺-thalassémie. La mutation démasque un site d'épissage alternatif qui conduit à une synthèse avortée pour une partie de la chaîne β mutée. Dans le cas de l'hémoglobinose E, le problème n'est donc pas celui d'une protéine anormale, mais celui d'une synthèse en quantité insuffisante de cette protéine anormale. Les chaînes β mutées sont en trop faible quantité pour se lier aux chaînes α disponibles. Le bilan est donc une β⁺-thalassémie peu sévère.

• Répartition géographique

Elle concerne essentiellement les populations du Sud-Est asiatique, où sa prévalence peut s'élever jusqu'à 60 % dans certaines régions. En raison d'une forte immigration des populations du Sud-Est asiatique vers

les pays occidentaux, on l'observe aujourd'hui partout dans le monde.

• Diagnostic biologique

Lors de l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin, l'HbE migre comme les HbC et HbA₂, près de l'HbO-Arab. En CLHP sur échangeur de cations, l'HbE coélué avec l'HbA₂. Elle peut être distinguée des autres Hb lentes par focalisation isoélectrique, électrophorèse capillaire ou bien par électrophorèse sur gel d'agar, où elle se comporte comme l'HbA.

• Tableaux clinique et biologique

Cette anomalie est bien supportée dans sa forme hétérozygote. L'hémogramme est normal, il peut montrer une microcytose ou une discrète anémie. Les taux d'HbE sont d'environ 30 %.

Chez l'homozygote, les effets sont mineurs, se limitant à une anémie microcytaire hypochrome modérée. L'HbA est absente, le taux d'HbE varie entre 85 et 99 %. Le taux d'HbF est variable, généralement inférieur à 15 %. Néanmoins, de grandes variations peuvent être observées, et il est indispensable d'interpréter les résultats en fonction du contexte clinique et familial pour discuter l'éventualité d'une association HbE/β⁰-thalassémie et proposer un diagnostic moléculaire.

L'attention doit se porter sur les formes associées :

– l'association HbE/α-thalassémie se caractérise par

des taux d'HbE anormalement bas et doit faire rechercher une α -thalassémie dans le cadre du conseil génétique ;

- l'association HbE/ β -thalassémie, fréquente en Thaïlande et dans tout le Sud-Est asiatique, se présente généralement sous forme d'une thalassémie intermédiaire. Elle est suggérée par un taux anormalement élevé d'HbE. En cas d'hétérozygotie composite HbE/ β^0 -thalassémie, le taux d'HbE varie de 40 à 60 % et le taux d'HbF est de l'ordre de 30 à 60 %. En cas d'hétérozygotie composite HbE/ β^+ -thalassémie, on observe également environ 10 % d'HbA.

– HbO-Arab

L'HbO-Arab est un mutant de la chaîne β où l'acide glutamique en position 121 est remplacé par une lysine.

- Répartition géographique

On le retrouve en Europe orientale, mais également en Afrique et dans le Moyen-Orient.

- Diagnostic biologique

Il comigre avec les HbC et E lors de l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin, mais peut facilement en être différencié par électrophorèse sur gel d'agar, en focalisation isoélectrique ou en CLHP sur échangeur de cations.

- Tableaux clinique et biologique

Ce variant n'entraîne aucune anomalie chez les hétérozygotes et les homozygotes.

C'est l'association HbO-Arab/HbS qui est grave, puisqu'elle conduit à un syndrome drépanocytaire majeur avec anémie hémolytique et crises vaso-occlusives. Il est donc important d'en faire le diagnostic, tant dans le cadre du conseil génétique que de la prise en charge précoce des malades.

– HbD-Punjab

L'HbD-Punjab est un mutant de la chaîne β où l'acide glutamique en position 121 est remplacé par une glutamine.

- Répartition géographique

Ubiquitaire, on le retrouve avec une forte prévalence chez les Sikhs du Punjab et dans les populations du nord-ouest des Indes.

- Diagnostic biologique

L'HbD-Punjab se distingue de l'HbS en focalisation isoélectrique ou en CLHP sur échangeur de cations. Néanmoins, elle peut être confondue avec d'autres variants et son identification formelle nécessite l'utilisation de techniques complémentaires.

- Tableaux clinique et biologique

Cette Hb est asymptomatique aussi bien à l'état hétérozygote qu'homozygote.

C'est l'association HbD-Punjab/HbS qui est grave, puisqu'elle conduit à un syndrome drépanocytaire majeur avec anémie hémolytique et crises vaso-occlusives. Il est donc important d'en faire le diagnostic, tant dans le cadre du conseil génétique que de la prise en charge précoce des malades.

– Hb instables

Quelque 200 mutants dont la stabilité est diminuée ont été décrits. Seule la moitié d'entre eux est responsable d'anomalies cliniques.

La présence d'une Hb instable est souvent suggérée par un tableau clinique et hématologique d'anémie hémolytique régénérative. Une grande anisocytose, la présence de ponctuations basophiles, une macrocytose contrastant avec une CCMH diminuée sont des manifestations caractéristiques. Selon les cas, l'Hb peut être mise en évidence par focalisation isoélectrique ou CLHP sur échangeur de cations. Souvent, on observe non pas l'Hb anormale elle-même, mais des produits qui en dérivent.

Les Hb les plus instables sont détruites très rapidement après leur synthèse, et conduisent souvent à des tableaux d'érythropoïèse inefficace de type thalassémie. La différence essentielle entre ce syndrome et une thalassémie classique réside dans son mode de transmission qui est de type dominant, d'où le terme « thalassémies dominantes » souvent utilisé pour les désigner. Leur identification nécessite généralement l'utilisation de techniques de biologie moléculaire.

– Hb hyperaffines

Les mutations responsables n'ont été décrites qu'à l'état hétérozygote, la forme homozygote étant probablement létale. Les patients présentent une polyglobulie sans augmentation des leucocytes ou des plaquettes et sans splénomégalie. Le diagnostic doit éliminer toutes les causes de polyglobulie primitive ou secondaire. Les méthodes électrophorétiques sont souvent peu contributives. L'étude de la p50 est essentielle, mais seule

l'étude moléculaire permet de confirmer et d'identifier le mutant.

– Hb hypoaffines

Peu de variants de ce type ont été décrits. Ils engendrent une cyanose, présente dès la naissance si la mutation porte sur la chaîne α .

– HbM

La méthémoglobine (metHb) est une forme oxydée d'Hb, dans laquelle l'atome de fer à l'état oxydé Fe^{3+} est incapable de transporter l'oxygène. Son taux est physiologiquement inférieur à 1 %, un taux supérieur à 1 % définissant la méthémoglobinémie. Deux types de méthémoglobinémies doivent être distingués :

- méthémoglobinémies résultant d'une surproduction acquise ou constitutionnelle de metHb ;
- méthémoglobinémies dues à la présence d'un variant aux propriétés spectrales particulières désigné sous le terme d'HbM. Ces affections sont rares ; les mutations en cause portent sur la chaîne α ou β .

Les patients porteurs d'une HbM présentent une pseudo-cyanose. L'hémogramme est généralement normal mais la présence d'HbM est suggérée par la couleur brun chocolat typique du sang. Les techniques séparatives ne sont pas toujours contributives. Quand il est visible, le variant d'Hb a un taux situé entre 10 et 25 %. L'étude du spectre d'absorption de l'hémolysat est caractéristique et permet de différencier la metHb normale de l'hémoglobine M. Il est important de poser le diagnostic afin d'éviter au patient des explorations cardiovasculaires lourdes et inutiles, particulièrement chez le nouveau-né.

Thalassémies

Les thalassémies sont les maladies génétiques les plus répandues au monde.

Normalement, la synthèse des chaînes de type α et de type non α est équilibrée. Dans les thalassémies, il existe un déficit partiel ou total de synthèse d'une chaîne. On peut classer les thalassémies selon la chaîne de globine touchée et on distingue ainsi :

- les α -thalassémies ;
- les β -thalassémies ;
- les δ - et γ -thalassémies (sans effet clinique) ;
- les $\delta\beta$ -thalassémies quand les chaînes δ et β sont touchées.

Selon que le défaut de synthèse est total ou partiel, on différencie :

- les formes qualifiées de « + », où la protéine est synthétisée mais en quantité limitée ;
- les formes désignées comme « ° », où le gène atteint ne permet aucune synthèse.

La présentation clinique permet de classer les thalassémies en formes mineures, majeures ou intermédiaires :

- les thalassémies mineures : elles sont également appelées « trait thalassémique » et n'ont habituellement aucune traduction clinique. Sur le plan moléculaire, elles correspondent aux β -thalassémies, aux $\delta\beta$ -thalassémies hétérozygotes et aux α -thalassémies avec délétion d'un ou deux gènes α ;
- les thalassémies majeures : elles associent à des degrés variables hémolyse sévère, érythroïtose inefficace et surcharge en fer, nécessitant des transfusions sanguines régulières. Elles correspondent à des formes où les deux gènes β sont atteints par une lésion thalassémique grave ;
- les thalassémies intermédiaires : elles forment un groupe très hétérogène où sont rassemblés tous les patients dont l'expression clinique et hématologique est plus sévère que celle d'une thalassémie mineure, sans toutefois atteindre celle d'une thalassémie majeure. Les malades, avec un taux d'Hb entre 6 et 9 g/dl, ne nécessitent que d'exceptionnelles transfusions sanguines. Sur le plan moléculaire, on retrouve des homozygotes ou hétérozygotes composites pour diverses anomalies. L'hémoglobine H, due à la défaillance de 3 gènes α , peut également être classée dans cette catégorie.

Le dépistage des sujets hétérozygotes est essentiel pour informer du risque d'avoir un enfant homozygote malade. Le dépistage doit être proposé devant un hémogramme évocateur, dans une ethnie à risque, lors d'enquêtes familiales ou à l'occasion des visites prénuptiales. Le trait thalassémique peut également être évoqué devant un taux d'HbS, HbC ou HbE anormalement bas ou anormalement élevé.

Le dépistage doit être suivi d'un conseil génétique et éventuellement d'un diagnostic anténatal par des techniques de biologie moléculaire.

– α -thalassémies

Les α -thalassémies s'expriment à travers une gamme de sévérité variable, directement fonction du nombre de gènes défectueux. Chaque chromosome 16 portant deux gènes α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$), il existe donc quatre gènes α chez le sujet normal. Au total, un, deux, trois ou même quatre gènes peuvent être non exprimés.

La classification des anomalies est la suivante :

- expression d'un seul gène α sur le chromosome $\rightarrow \alpha^+$ -thalassémie ;
- absence d'expression des deux gènes α sur le chromosome $\rightarrow \alpha^0$ -thalassémie.

La non-expression d'un ou deux gènes α est cliniquement asymptomatique. La non-expression de trois gènes α définit l'hémoglobinosose H, qui est une anémie hémolytique par excès de chaînes β libres. La non-expression des quatre gènes α est létale, avec une anasarque fœtoplacentaire dès la période fœtale, quand s'éteint l'expression des gènes embryonnaires.

- Thalassémie α^+ : hétérozygotes, homozygotes et hétérozygotes composites

L' α^+ -thalassémie est l'anomalie génétique la plus répandue dans le monde.

Elle résulte généralement de la délétion totale ou partielle du gène $\alpha 2$. Environ un quart des individus originaires d'Afrique sont porteurs hétérozygotes et 1 à 2 %, porteurs homozygotes. Elle est également observée dans d'autres populations originaires du Bassin méditerranéen, du Sud-Est asiatique ou d'Inde (où elle touche 40 % de la population).

Plus rarement, elle résulte d'une mutation ponctuelle sur un gène α . Il est probable que certaines mutations affectant le gène $\alpha 1$ passent inaperçues et soient à l'origine de thalassémies dites silencieuses.

Il est à noter que certains variants de la chaîne α produisent un phénotype d' α^+ -thalassémie : c'est le cas de l'Hb Constant-Spring où l'ARNm du variant α est très instable.

α^+ -thalassémie hétérozygote

Elle est cliniquement asymptomatique.

Les sujets peuvent avoir un hémogramme normal, parfois une légère microcytose ou une discrète anémie microcytaire hypochrome.

Le diagnostic est habituellement évoqué chez un individu porteur d'une microcytose non expliquée par une β - ou $\delta\beta$ -thalassémie ou une carence martiale. L'étude de l'Hb est normale, le taux d'HbA₂ est généralement normal. En période néonatale, il est parfois possible de détecter 1 à 2 % d'Hb Bart's.

Néanmoins, beaucoup de porteurs ayant un hémogramme normal, le diagnostic est souvent méconnu en dehors des études systématiques de populations ou des enquêtes familiales en cas d'hémoglobinosose H.

Le diagnostic de certitude nécessite une étude moléculaire et n'est envisagé que dans le cadre du conseil génétique.

α^+ -thalassémie homozygote

Elle est également cliniquement asymptomatique. Sur le plan biologique, les sujets présentent des anomalies hématologiques plus franches, proches de celles habituellement observées chez les sujets β -thalassémiques hétérozygotes. L'étude de l'Hb est normale avec un taux d'HbA₂ normal, parfois diminué. En période néonatale, on peut détecter des taux d'Hb Bart's supérieurs à 2 %. Comme chez les hétérozygotes, le diagnostic est évoqué devant une étude de l'Hb normale chez un sujet microcytaire sans carence martiale et le diagnostic de certitude nécessite une étude moléculaire qui n'est proposée que dans le cadre du conseil génétique.

Hb Constant-Spring

Elle est cliniquement asymptomatique. Sur le plan biologique, les sujets hétérozygotes ont souvent une anémie plus marquée que les sujets porteurs d'un trait α^+ -thalassémique. Ce variant peut parfois être détecté à des taux très faibles (1 %). L'étude moléculaire est souvent indispensable pour porter le diagnostic.

L'existence d'une α^+ -thalassémie diminue l'expression clinique et biologique d'une β -thalassémie associée et réduit également les taux d'HbS, HbC et HbE habituellement observés chez les sujets hétérozygotes.

- Thalassémie α^0 : hétérozygotes et hétérozygotes composites

L' α^0 -thalassémie résulte généralement de la délétion des deux gènes α . Elle est relativement fréquente en Chine et dans le Sud-Est asiatique. Elle peut également être observée sur le pourtour du Bassin méditerranéen.

Chez les sujets hétérozygotes, on retrouve une pseudopolyglobulie microcytaire hypochrome. Le taux d'Hb peut être normal ou légèrement diminué. En période néonatale, on peut détecter 5 à 10 % d'Hb Bart's, mais cela n'est pas spécifique de l' α^0 -thalassémie puisque des taux similaires sont observés dans l' α^+ -thalassémie homozygote.

Le diagnostic est évoqué chez un sujet dont l'hémogramme suggère un trait thalassémique et dont l'étude de l'Hb met en évidence des taux d'HbA₂ et HbF normaux. Le diagnostic de certitude nécessite une étude moléculaire. Ces sujets hétérozygotes doivent être dépistés dans les populations à risque (asiatiques) en raison du risque mortel lié à l' α^0 -thalassémie homozygote.

Comme l' α^+ -thalassémie, l' α^0 -thalassémie diminue l'expression clinique et biologique d'une β -thalassémie

associée et diminue les taux de synthèse d'HbS, HbC et HbE habituellement observés chez les sujets hétérozygotes.

- Hémoglobinoses H

La non-expression de trois gènes α se traduit par l'hémoglobinoses H. Dans ce cas, l'anémie microcytaire hypochrome devient patente. Les chaînes β (ou γ chez le nouveau-né) sont en excès et s'associent en tétramères nommés HbH (4 chaînes β) ou Hb Bart's (4 chaînes γ). Ces Hb sont solubles et il n'y a donc pas de destruction intramédullaire ni d'érythropoïèse inefficace. Cependant, elles sont inaptes à la transition allostérique et donc incapables d'assurer l'oxygénation des tissus, ce sont des Hb non fonctionnelles. De plus, elles sont instables et précipitent en corps de Heinz dès qu'elles sont soumises à un stress oxydatif, ce qui est à l'origine d'une anémie hémolytique chronique. Les individus présentent une splénomégalie. L'anémie est aggravée par les infections, la grossesse et l'exposition aux agents oxydants. Le tableau clinique peut être de sévérité variable, asymptomatique chez certains patients, nécessitant des transfusions régulières pour d'autres.

Sur le plan moléculaire, elle peut correspondre à différentes anomalies génétiques dont la plus fréquente est

la forme $-\alpha$, résultant d'une hétérozygotie composite α^0 -thalassémie/ α^+ -thalassémie.

Sur le plan biologique, on retrouve une anémie microcytaire hypochrome, avec des taux d'Hb compris entre 3 et 10 g/dl. En période néonatale, on peut détecter 20 à 40 % d'Hb Bart's. Chez l'adulte, on retrouve 1 à 40 % d'HbH (généralement 8-10 %) et parfois jusqu'à 5 % d'Hb Bart's. L'HbA₂ est généralement diminuée (1 à 2 %) et parfois, le taux d'HbF est légèrement augmenté (1 à 3 %).

Le taux d'HbH est diminué en cas d'association avec un autre variant tel que HbS, HbC et HbE et le taux n'est pas toujours détectable quand il s'agit d' α -thalassémie non délétionnelle.

- Thalassémie α^0 homozygote






La non-expression des quatre gènes α est létale avec une anasarque fœtoplacentaire dès la période fœtale, quand s'éteint l'expression des gènes embryonnaires.

Il est essentiel de prévenir la survenue de telles formes par un conseil génétique et un diagnostic anténatal (tableau 9).

— β -thalassémies

Dans les β -thalassémies, ce sont les chaînes α qui sont en excès. Contrairement aux chaînes β , ces chaînes α

Tableau 9. Principales caractéristiques génétiques, cliniques et biologiques des α -thalassémies

Nombre de gènes α atteints (■)	Désignation	Tableau clinique	Tableau biologique	
			Hémogramme	Étude de l'Hb
1 	α^+ -thalassémie ($-\alpha/\alpha\alpha$)	Asymptomatique : thalassémie mineure	Variable : normal ou discrète microcytose	- 1 % d'Hb Bart's à la naissance - Normale chez l'adulte
2  	α^0 -thalassémie hétérozygote ($--/\alpha\alpha$) α^+ -thalassémie homozygote ($-\alpha/-\alpha$)	Bien tolérée : thalassémie mineure	Pseudo-polyglobulie microcytaire hypochrome Microcytose \pm discrète anémie	- 5 à 10 % d'Hb Bart's à la naissance - Normale chez l'adulte (HbA ₂ parfois diminuée)
3 	Hémoglobinoses H ($-\alpha/--$ par exemple)	Plus ou moins bien tolérée : thalassémie intermédiaire	Anémie hémolytique avec microcytose et hypochromie	- 20 à 40 % d'Hb Bart's à la naissance - 1 % 40 d'Hb H chez l'adulte - HbA ₂ diminuée, entre 1 et 2 % - HbF parfois augmentée, 1 à 3 %
4 	α^0 -thalassémie homozygote ($--/--$)	Mort fœtale <i>in utero</i> dans un tableau d'hydrops fœtal avec anasarque fœtoplacentaire	-	Étude moléculaire indispensable

libres sont incapables de s'associer entre elles et sont extrêmement instables. Elles sont responsables de l'apoptose et de l'érythropoïèse inefficace. Les β -thalassémies sont des maladies dysérythropoïétiques.

Les formes hétérozygotes sont asymptomatiques. Les formes homozygotes ou hétérozygotes composites sont toujours sévères et souvent fatales dès les premières années de vie en l'absence de transfusions sanguines.

Dans le cas des β -thalassémies, les formes délétionnelles sont exceptionnelles. Les anomalies moléculaires sont le plus souvent des mutations ou de courtes délétions ou insertions, limitées à quelques nucléotides. Plus de 200 lésions différentes ont été décrites. Les mutations sont classées en deux catégories, β° thal et β^{+} thal.

Les β -thalassémies sont très fréquentes dans une large région qui englobe le Bassin méditerranéen, l'Afrique, le Moyen-Orient, le sous-continent indien, le Sud-Est asiatique, la Mélanésie et de nombreuses îles du Pacifique. La fréquence de l'anomalie varie de 1 à 20 % dans ces régions. La présence d'un gène thalassémique assure un certain degré de protection contre le paludisme, ce qui explique cette large répartition.

- β -thalassémies hétérozygotes

Elles sont cliniquement asymptomatiques. Parfois, les sujets peuvent développer une anémie symptomatique au cours d'une hématopoïèse de stress (grossesse, infection).

L'hémogramme est variable : il peut être normal, montrer une microcytose isolée ou une pseudo-polyglobulie microcytaire hypochrome avec parfois une légère anémie.

Le diagnostic repose sur l'augmentation du taux d'HbA₂, généralement de l'ordre de 4 à 5 %. Il s'agit d'une augmentation relative et non pas absolue. Des taux plus élevés (toujours < 8 %) peuvent être observés, liés à certaines anomalies moléculaires en 5'.

Dans 30 à 50 % des cas, il existe une augmentation d'HbF associée, généralement comprise entre 2 et 7 %.

Certaines situations peuvent compliquer le diagnostic d'un trait thalassémique.

Période néonatale

Pendant cette période, le taux d'HbA₂ est bas et le diagnostic n'est pas possible. Cependant, entre 6 et 12 mois, le taux est plus élevé que chez les autres enfants et la vitesse de disparition de l'HbF est plus lente.

Trait thalassémique avec HbA₂ normale

Différentes situations sont susceptibles d'abaisser le taux d'HbA₂ et de masquer une β -thalassémie :

- la carence en fer : ne pas exclure une β -thalassémie en cas de carence martiale. Renouveler l'étude de l'Hb si la microcytose persiste après avoir corrigé la carence martiale ;
- la grossesse : dans ce cas, il est recommandé de faire une étude de l'Hb chez le conjoint ;
- la carence en folates ;
- une δ -thalassémie associée en *cis* ou en *trans* (rare) diminuant le taux d'HbA₂.

Trait thalassémique avec hémogramme normal et augmentation isolée du taux d'HbA₂

Cela est observé pour certaines mutations en cas d' α -thalassémie associée ou dans les maladies hépatiques avec macrocytose.

β -thalassémie silencieuse

Il existe des anomalies qui passent inaperçues à l'état hétérozygote et qui ne s'expriment qu'à l'état homozygote ou hétérozygote composite. Sur le plan biologique, hémogramme et étude de l'Hb sont généralement normaux et la β -thalassémie peut être confondue avec une α -thalassémie. Dans certains cas, on retrouve une augmentation isolée du taux d'HbF. Leur diagnostic repose sur l'étude de la synthèse des chaînes de globine et les techniques de biologie moléculaire.

- β -thalassémies dominantes

Les β -thalassémies dominantes conduisent à un phénotype de thalassémie intermédiaire chez un patient hétérozygote. Elles sont le résultat de mutants dont la structure est particulièrement instable. Les anomalies moléculaires sont très hétérogènes. On doit évoquer un variant hyperinstable quand on observe un phénotype de thalassémie intermédiaire dans une population où les mutations thalassémiques sont rares ou absentes. Le diagnostic est moins facile à évoquer dans les populations où les thalassémies sont fréquentes.

Le diagnostic repose sur des techniques de biologie moléculaire, car le variant est trop instable pour être retrouvé dans le sang périphérique.

- Trait d'Hb Lepore

Les Hb Lepore forment un groupe particulier de β^{+} -thalassémies. Ces Hb résultent d'un *crossing-over* non homologue entre les gènes δ et β , l'extrémité 5' du

gène recombinant étant de type δ et l'extrémité 3' de type β . Le chromosome qui porte le gène recombinant ne porte ni le gène δ , ni le gène β . Le promoteur étant de type δ , le gène recombinant est peu exprimé, de l'ordre de 10 à 15 %, et répond à la définition d'un gène β^+ -thalassémique. En fonction de la région où s'est produit le *crossing-over*, on distingue plusieurs variétés d'Hb Lepore.

Les sujets hétérozygotes ont un hémogramme évocateur de β -thalassémie. L'étude de l'Hb retrouve un variant en faible quantité (10 à 15 %) qui migre près de l'HbS à l'électrophorèse à pH alcalin, près de l'HbA à pH acide et coélue avec l'HbA₂ en CLHP.

- Hb Lepore homozygote ou hétérozygote composite

Les homozygotes ou hétérozygotes composites Hb Lepore/ β -thalassémie présentent un tableau de thalassémie majeure ou intermédiaire. L'étude de l'Hb ne retrouve que de l'HbF et de l'Hb Lepore.

- β -thalassémies intermédiaires

Définies sur le plan clinique, elles regroupent tous les patients dont l'expression clinique et hématologique est plus sévère que celle d'une thalassémie mineure sans toutefois atteindre celle d'une thalassémie majeure. Les malades, avec un taux d'Hb entre 6 et 9 g/dl, ne nécessitent que d'exceptionnelles transfusions sanguines.

Sur le plan moléculaire, on retrouve :

- des homozygotes ou hétérozygotes composites pour des thalassémies peu graves (exemple : HbE/ β -thalassémie) ;
- une thalassémie majeure dont l'expression est atténuée par une autre anomalie (par exemple, synthèse élevée d'HbF) ;
- l'association thalassémie/anomalie de l'Hb aggravant une atteinte hétérozygote (par exemple, triplification α aggravant une β -thalassémie) ;
- l'association thalassémie/Hb instable.

Sur le plan biologique, on retrouve constamment une anémie microcytaire hypochrome plus ou moins bien supportée, avec parfois des érythroblastés circulants. L'étude de l'Hb retrouve des taux d'HbA₂ et d'HbF élevés, variables en fonction du type d'anomalies moléculaires en cause. L'absence d'HbA oriente vers une β^0 -thalassémie, la persistance d'HbA en proportion diminuée oriente vers une β^+ -thalassémie. Elle peut également mettre en évidence un variant thalassémique tel que l'HbE.

Le diagnostic repose sur des techniques de biologie moléculaire qui précisent la nature des anomalies et permettent de rechercher une α -thalassémie associée.

- β -thalassémies majeures

Il n'y a pas d'anémie à la naissance, puisque l'HbF est le principal constituant à ce moment de la vie. C'est au cours des premiers mois que le déficit de synthèse des chaînes β commence à s'exprimer. L'anémie apparaît rapidement. L'érythropoïèse inefficace est le principal mécanisme de l'anémie. Certains érythroblastés, notamment ceux qui fabriquent de l'HbF, peuvent donner naissance à une hématie microcytaire hypochrome déformée, qui a une demi-vie raccourcie et qui rend compte du deuxième mécanisme de l'anémie : l'hyperhémolyse. L'anémie profonde induit une sécrétion d'érythropoïétine qui provoque une hyperplasie de la lignée érythroblastique, responsable, à long terme, de déformations osseuses caractéristiques. Une hépatosplénomégalie s'installe progressivement. L'évolution est fatale dans les premières années de vie en l'absence de transfusions sanguines.

Les thalassémies majeures représentent un problème majeur de santé publique dans certaines régions. Aujourd'hui, le pronostic est transformé grâce à l'utilisation de programmes transfusionnels adaptés et de l'utilisation de chélateurs de fer, limitant la surcharge en fer.

Sur le plan biologique, l'anémie est microcytaire hypochrome, souvent inférieure à 7 g/dl. L'étude de l'Hb montre un taux d'HbF constamment élevé. Le taux d'HbA₂ est normal ou augmenté. Un faible taux d'HbA persiste dans les β^+ -thalassémies.

L'information des familles à risque est essentielle. Le dépistage des hétérozygotes vise à les informer du risque d'avoir un enfant homozygote malade. Le dépistage peut être fait lors d'enquêtes familiales, dans l'exercice quotidien auprès des ethnies à risque ou à l'occasion des visites prénuptiales. Il doit être suivi d'un conseil génétique et éventuellement d'un diagnostic anténatal par des techniques de biologie moléculaire.

- $\delta\beta$ -thalassémies et persistance héréditaire de l'HbF (PHHF)

Les $\delta\beta^0$ -thalassémies résultent de la délétion des deux gènes δ et β . Elles s'observent chez différentes ethnies du Bassin méditerranéen.

La PHHF peut résulter de différents types d'anomalies moléculaires. On distingue :

- les PHHF délétionnelles, qui résultent de délétions larges incluant les gènes δ et β ;
- les PHHF non délétionnelles, qui forment un groupe hétérogène de lésions stimulant la synthèse d'HbF.

Les formes délétionnelles de PHHF et les $\delta\beta$ -thalassémies ont d'abord été considérées comme des

syndromes distincts, mais aujourd'hui, de nombreux auteurs considèrent qu'il est difficile d'établir une frontière nette entre ces deux anomalies.

Classiquement, on admet que les sujets hétérozygotes pour une $\delta\beta$ -thalassémie ont des paramètres hématologiques similaires à ceux observés dans une β -thalassémie avec un taux d'HbF significativement augmenté, allant de 5 à 15 %, de distribution hétérocellulaire.

Les homozygotes (qui présentent 100 % d'HbF) ou les hétérozygotes composites avec une β -thalassémie présentent généralement un tableau de thalassémie intermédiaire.

L'Hb Lepore peut être considérée comme une forme de $\delta\beta^0$ -thalassémie.

À l'inverse, les sujets hétérozygotes pour une PHHF ont des paramètres hématologiques normaux et un taux d'HbA₂ le plus souvent normal. Ce qui les distingue est le taux d'HbF élevé, de l'ordre de 15 à 30 %, avec une distribution pancellulaire plus homogène. Les sujets homozygotes sont cliniquement normaux, avec uniquement une pseudopolyglobulie microcytaire hypochrome. Les sujets hétérozygotes composites avec une β -thalassémie présentent un syndrome thalassémique peu sévère.

En pratique, plus le nombre de cas rapporté dans la littérature augmente, plus on s'aperçoit d'un chevauchement considérable des paramètres érythrocytaires autrefois supposés distinguer ces deux syndromes.

- $\epsilon\gamma\delta\beta$ -thalassémies

De rares mutations sont responsables d'une délétion complète ou d'une inactivation totale du cluster des gènes β . Seuls des sujets hétérozygotes ont été décrits, l'état homozygote étant vraisemblablement léthal.

Le phénotype est celui d'un trait thalassémique sans élévation des taux d'HbA₂ et HbF. Le diagnostic passe par l'étude de la synthèse des chaînes ou l'étude moléculaire.

- δ -thalassémies

Elles n'ont pas de signification clinique. Leur association, en *cis* ou en *trans*, avec un gène β -thalassémique a pour conséquence la non-élévation du taux d'HbA₂, ce qui peut faire méconnaître le trait thalassémique.

TECHNIQUES D'ÉTUDE DE L'HÉMOGLOBINE

Généralement, 5 ml de sang sur anticoagulant (EDTA le plus souvent) suffisent pour une étude classique.

L'échantillon peut se conserver au maximum 8 jours à +4 °C.

Dans la majorité des cas, le diagnostic d'une hémoglobinopathie repose sur l'analyse du phénotype.

L'étude de l'Hb utilise essentiellement des méthodes séparatives. La pratique d'une seule technique n'est pas recommandée pour deux raisons principales :

- un profil normal, quel que soit le système utilisé, ne permet pas d'éliminer un variant de l'Hb ;
- plusieurs variants peuvent se comporter de la même façon dans un système.

L'interprétation des résultats doit tenir compte de l'âge du patient, de son origine ethnique, des antécédents familiaux et du contexte clinique de la prescription. Il est recommandé de faire l'analyse à distance d'une transfusion (3 mois au minimum) et de confronter les résultats à l'hémogramme ainsi qu'au bilan martial.

Électrophorèses

— Électrophorèse à pH alcalin sur acétate de cellulose

Facile à mettre en œuvre, cette technique a longtemps été la méthode de choix pour le dépistage des Hb anormales. Pour les Hb anormales, la position « D » est compatible avec les traits : HbS, HbD, HbG, Hb Lepore. La position « C » est compatible avec HbC, HbE et HbO-arab. Elle est mise en défaut chez le nouveau-né où l'HbF est mal séparée des HbA et HbS. Son faible pouvoir discriminant pour des mutants ayant même différence de charge devrait conduire à son remplacement par des techniques plus résolutive comme la focalisation isoélectrique ou la CLHP d'échange d'ions pour le dépistage des Hb anormales. De plus, elle n'est pas suffisamment précise pour quantifier les fractions mineures, HbA₂ et HbF, étape fondamentale dans le diagnostic des formes mineures de thalassémie.

— Électrophorèse sur gel d'agar à pH acide

Cette technique est appliquée à l'identification des Hb anormales préalablement identifiées par l'électrophorèse à pH alcalin ou la focalisation isoélectrique. Ici, la mobilité de la molécule d'Hb ne dépend pas de sa charge mais des modifications structurales induites par la mutation dans certaines régions de la molécule qui interagissent avec l'agaropectine du gel. Cette technique est très sensible aux conditions expérimentales, ce qui rend parfois sa reproductibilité difficile.

– *Électrophorèse capillaire*

Cette technique, récemment adaptée à l'étude des Hb, est rapide, automatisée et offre une approche plus résolutive que celle de l'électrophorèse à pH alcalin.

Focalisation isoélectrique sur gel d'agarose ou de polyacrylamide

Cette technique semi-automatisée, plus longue et plus complexe à mettre en œuvre que l'électrophorèse sur acétate de cellulose, permet de traiter de grandes séries et offre une meilleure résolution. Elle utilise la différence de point isoélectrique des Hb et c'est une méthode de choix pour la détection des Hb anormales. Néanmoins, comme la précédente, cette technique présente l'inconvénient de ne pas permettre d'effectuer un dosage précis des diverses fractions ni de différencier HbS de HbD, HbG et Hb Lepore, non plus que HbC et HbE de HbO-Arab.

Chromatographie liquide haute performance (CLHP) sur colonne échangeuse de cations

Cette méthode automatisée et adaptée à de grandes séries est aujourd'hui considérée par de nombreux laboratoires comme la méthode de choix pour quantifier les différentes fractions d'Hb normales et anormales. C'est déjà la technique de référence pour le dosage de l'Hb glyquée dans le diabète. Elle pourrait être amenée à remplacer les techniques électrophorétiques dans le dépistage des Hb anormales fréquentes. Calibrée pour les fractions HbA₂ et HbF, elle est d'une excellente précision pour leur dosage. L'identification présomptive des variants les plus courants (HbS, HbC) est faite par leur temps d'élution à l'intérieur de « fenêtres » définies par le constructeur. Néanmoins, d'autres variants pouvant coéluer avec les Hb anormales les plus courantes, il reste impératif de confronter les résultats à ceux obtenus par une technique électrophorétique.

Détection spécifique d'HbS

– *Test de falciformation*

Le test d'Itano est encore utilisé de nos jours quand rien de plus précis n'est disponible. Il consiste à sceller une goutte de sang entre lame et lamelle et attendre que les processus oxydatifs induisent une falciformation visible au microscope. Ce test ne permet pas de différencier un hétérozygote d'un homozygote et n'est pas sensible aux taux faibles observés chez un nouveau-né.

Sa variante, connue sous le nom de test d'Emmel, consiste à utiliser une solution de métabisulfite de sodium pour provoquer la falciformation.

– *Test de solubilité*

Ce test est hautement spécifique de l'HbS, qui, lorsqu'elle est désoxygénée par de l'hydrosulfite de sodium, précipite en milieu salin concentré. La lecture du trouble est semi-quantitative et ne permet pas de faire la distinction entre les diverses formes génétiques de drépanocytose. Ce test peut être faussement négatif chez les sujets porteurs d'un taux faible.

Quantification d'HbA₂

La quantification précise du taux d'HbA₂ est essentielle au dépistage d'un trait thalassémique. La mesure densitométrique des bandes d'électrophorèse est à proscrire (CV > 20 %).

Deux techniques automatisées et applicables en série sont utilisables : la CLHP et la chromatographie sur microcolonne (qui présente l'inconvénient d'être sensible aux variations de température). L'électrophorèse capillaire pourrait également être utilisable.

À partir de l'âge de 6 mois et en l'absence de toute hémoglobinopathie, le taux d'HbA₂ mesuré en CLHP varie de 2 à 3,2 %.

Trois situations sont susceptibles d'augmenter artificiellement la fraction d'HbA₂ par contamination :

- modifications post-traductionnelles de l'HbA (glycation, carbamylation, désamination...) ; ces fractions plus acides sont éluées plus rapidement que la fraction majeure en HPLC ;
- fractions mineures d'un mutant lent de l'Hb (HbS, HbD, HbC...). Le taux d'HbA₂ est difficile à interpréter. Dans ce cas, c'est la mesure précise du taux du variant d'Hb qui permet de suspecter une éventuelle thalassémie associée ;
- présence d'HbE qui coélue avec l'HbA₂ : dans ce cas, la mesure est impossible en HPLC. Un taux d'HbA₂ supérieur à 8 % doit faire suspecter un variant (HbE, Hb Lepore...).

La présence d'un variant de la chaîne α ou δ diminue le taux d'HbA₂.

Quantification d'HbF

L'HbF est majoritaire au cours de la vie fœtale et des 2 premiers mois de vie. Une légère augmentation (< 3 %) peut persister jusqu'à 5 ans, en l'absence de toute hémoglobinopathie. Au-delà, le taux est inférieur à 1 %.

Le taux d'HbF doit être déterminé avec précision chez le sujet drépanocytaire. Il est également très utile dans le diagnostic des thalassémies.

La CLHP est la technique de choix.

Le chromatogramme doit être examiné avec attention pour ne pas confondre l'HbF avec l'Hb glyquée, un autre variant coéluant dans cette région (HbJ ou HbN), ou des fractions liées à un échantillon vieilli.

La méthode de Betke de résistance à la dénaturation alcaline est également envisageable pour les taux inférieur à 15 %.

Interprétation des résultats

– Mise en évidence d'une Hb anormale

Les HbS, HbC et HbE peuvent être aisément identifiables par une combinaison appropriée de techniques séparatives. L'interprétation des résultats doit prendre en compte l'origine ethnique des patients. Le taux du variant doit orienter vers un éventuel syndrome thalassémique associé.

Pour les HbS et C, le taux est d'environ 40 % et le patient d'origine africaine. Un taux inférieur à 35 % doit faire rechercher une α -thalassémie associée tandis qu'un taux supérieur à 55 % oriente vers une β -thalassémie associée.

Pour les HbE, le taux est de l'ordre de 30 %, associé à un hémogramme évocateur de thalassémie chez un patient d'origine asiatique.

Un taux inférieur à 20 % associé à une microcytose oriente plutôt vers une Hb Lepore dont l'identification doit être confiée à un laboratoire spécialisé.

Le diagnostic des homozygoties ne peut être posé sans une étude familiale. En effet, par exemple, le profil d'une forme SS ne diffère pas de celle d'une association HbS/ β^0 thal ou HbS/PHHF.

L'identification des autres variants nécessite d'avoir recours à des techniques spécialisées.

– Absence de fractions anormales

• Profil normal

Un profil normal, avec des taux d'HbA₂ et HbF normaux, doit être interprété en fonction de l'hémogramme, du bilan martial, de l'origine ethnique, du contexte clinique, familial et transfusionnel du patient.

- Chez une femme enceinte, un profil normal sans microcytose ou carence martiale associée ne permet pas d'éliminer formellement l'éventualité d'une β -thalassémie hétérozygote. Il est conseillé de faire un hémogramme et une étude de l'Hb chez le conjoint.
- Un profil normal avec microcytose associée sans carence martiale doit faire évoquer une α -thalassé-

mie probable ou une β -thalassémie dite silencieuse. Dans un contexte de grossesse, il est préconisé de faire un hémogramme et une étude de l'Hb chez le conjoint.

- Un profil normal en présence de carence martiale doit faire l'objet d'un contrôle après correction de la carence si la microcytose persiste.

• Augmentation du taux d'HbA₂

Dans un contexte de microcytose, ce profil évoque une β -thalassémie hétérozygote. Dans près de la moitié des cas, le taux d'HbF est également modérément augmenté (généralement < 5 %). Un taux d'HbF supérieur à 5–7 % doit faire discuter une $\delta\beta$ -thalassémie.

L'augmentation acquise de l'expression de l'HbA₂ est rare, observée au cours d'hyperthyroïdies non traitées, dans les anémies mégalo-blastiques ou chez des patients porteurs du VIH traités par des antiviraux.

• Augmentation du taux d'HbF

Après l'âge de 5 ans, on distingue deux types de causes d'augmentation :

– les augmentations constitutionnelles :

- PHHF : taux d'HbF entre 15 et 30 % chez les hétérozygotes, 100 % chez les homozygotes ;
- $\delta\beta$ -thalassémies : paramètres évoquant un trait thalassémique et taux d'HbF entre 5 et 15 % chez les hétérozygotes, 100 % chez les homozygotes ;
- β -thalassémies hétérozygotes (généralement < 5 %), homozygotes et hétérozygotes composés ;
- syndromes drépanocytaires majeurs où le taux d'HbF est variable ;
- Hb Lepore ;
- Hb instables ;
- dysérythro-poïèse congénitale et certaines hémolyses congénitales.

– les augmentations acquises, observées dans différentes situations :

- au cours de la grossesse : chez 15 à 20 % des femmes, le nombre de cellules F augmente et le taux d'HbF peut atteindre 5 % ;
- au cours de l'érythro-poïèse de stress observée lors des phases de récupération des anémies carenciales ou lors de perturbations de l'érythro-poïèse (hémolyses acquises, myélodysplasies, aplasie médullaire, hémoglobinurie paroxystique noc-

turne, chimiothérapies, traitement par érythropoïétine et acide valproïque) ;

- traitements médicamenteux utilisés dans les syndromes drépanocytaires majeurs ;
- au cours du diabète et de l'hyperthyroïdie non traitée.

- Diminution du taux d'HbA₂

Après l'âge de 6 mois, une diminution de l'expression de l'HbA₂ peut être observée dans diverses situations :

- cause fréquente :
 - carence martiale profonde.
- causes plus rares :
 - anémies inflammatoires ;
 - certaines $\delta\beta$ -thalassémies ;
 - δ -thalassémies ;
 - trait α -thalassémique ;
 - hémoglobinoïde H ;
 - anémies sidéroblastiques congénitales.

L'absence complète d'HbA₂ est beaucoup plus rare, liée aux $\delta\beta$ -thalassémies homozygotes ou variants de l'HbA₂ à l'état homozygote.

Examens spécialisés

Ce sont des examens de deuxième intention, généralement réalisés pour compléter les tests préalablement décrits :

- test de stabilité à l'isopropanol destinés à mettre en évidence les Hb instables ;
- mesure de l'affinité pour l'oxygène (calcul de la P50) et dosage de 2-3 DPG pour compléter l'étude des Hb à affinité modifiée ;
- dosages chromatographiques des chaînes de globine en phase inverse ;
- analyse spectrophotométrique pour mettre en évidence la méthémoglobine.

Les techniques de biologie moléculaire sont essentiellement utilisées dans le cadre du conseil génétique et du diagnostic anténatal. Elles sont destinées à identifier les couples à risque et à mesurer le risque éventuel pour l'enfant.

Dans le cas de la drépanocytose, l'étude des parents n'est généralement pas nécessaire.

Pour le diagnostic moléculaire de β -thalassémie, la stratégie repose sur la recherche des anomalies les plus fréquemment observées dans l'ethnie du patient étudié. Deux techniques dérivées de la PCR sont le plus souvent utilisées :

- l'hybridation par un oligonucléotide allèle-spécifique (*allele specific oligonucleotide* [ASO]) ;
- l'amorçage allèle-spécifique (*allele specific priming* [ASP]).

Les grandes délétions peuvent être identifiées par gap-PCR. Quand l'identification de l'anomalie résiste aux tests de première intention, le diagnostic nécessite de déterminer la séquence nucléotidique du gène et de ses régions de contrôle.

Le diagnostic moléculaire d' α -thalassémie délétionnelle utilise la gap-PCR. Les α -thalassémies non délétionnelles sont rares et sont identifiées par une sonde spécifique ou un séquençage de l'ADN.

Drépanocytose, Méthémoglobine



Bain BJ.
Haemoglobinopathy diagnosis. – 2nd edition.
Oxford : Blackwell Publishing, 2006 ; 313 p.

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 2003 ; 61 : 401-409.

Wajcman H.
Hémoglobines et hémoglobinopathies.
Disponibilité sur : http://rbc.gs-im3.fr/DATA/VFHW_CD/VFMenu1.html