

# LES CAHIERS CERBA

## *Recommandations pour la mise en œuvre et l'interprétation de l'étude de l'hémoglobine*

■ ■ ■ *par Isabelle Vinatier, Biologiste - Laboratoire CERBA*

## SOMMAIRE

### RAPPELS SUR L'HÉMOGLOBINE

1) Structure de la molécule d'Hb	p. 3
2) Gènes de l'Hb	p. 3
3) Différentes Hb humaines	p. 3

### HÉMOGLOBINOPATHIES

1) Types d'hémoglobinopathies	p. 4
2) Variants fréquents	p. 4
● HbS	p. 4
● HbC	p. 6
● HbE	p. 7
3) Thalassémies	p. 8
● $\alpha$ -thalassémies	p. 8
● $\beta$ -thalassémies	p. 10
● $\delta\beta$ -thalassémies et persistance héréditaire de l'HbF	p. 11
● $\delta$ -thalassémies	p. 11

### ETUDE DE L'HÉMOGLOBINE

1) Circonstances de prescription	p. 12
2) Conditions nécessaires à l'interprétation des résultats	p. 12
3) Prélèvement	p. 12
4) Valeurs normales	p. 12
5) Techniques	p. 12
6) Nomenclature des actes de biologie médicale (janier 2010)	p. 13
7) Recommandations de la S.F.B.C.	p. 13
8) Caractéristiques des différentes techniques de l'étude de l'hémoglobine	p. 14

### INTERPRÉTATIONS DES RÉSULTATS

p. 18

### EXEMPLES

p. 23

Ce cahier est destiné à guider les biologistes dans le diagnostic des hémoglobinopathies à l'aide d'algorithmes décisionnels. Il souligne l'importance du contexte de la prescription et rappelle que l'électrophorèse de l'hémoglobine (Hb), bien qu'encore inscrite en tant que telle à la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale, est insuffisante quand elle est utilisée seule.

Les hémoglobinopathies correspondent aux anomalies génétiques qui touchent la partie protéique de l'Hb. Ce sont les affections héréditaires 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 souvent 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 : ce sont les syndromes drépanocytaires majeurs et les thalassémies.

On ne connaît pas la fréquence des porteurs asymptomatiques en France. Concernant les patients symptomatiques, en 2009, les registres nationaux faisaient état de plus de 10000 patients drépanocytaires. Les syndromes thalassémiques majeurs ou intermédiaires sont plus rares car on ne dénombre que 380 patients et ce nombre semble stable.

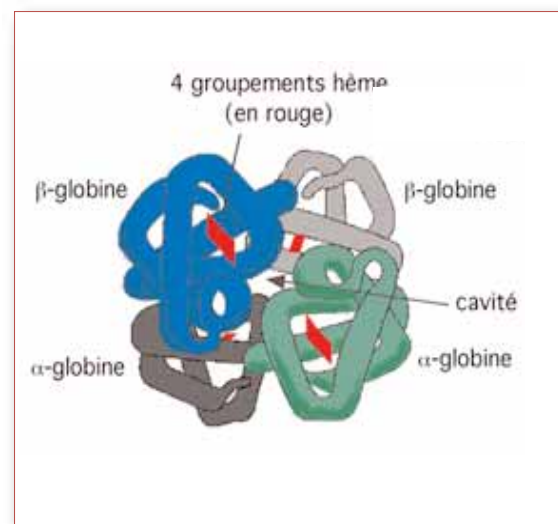
La prévention des hémoglobinopathies passe par le dépistage des porteurs asymptomatiques du trait drépanocytaire ou du trait thalassémique.

## RAPPELS SUR L'HEMOGLOBINE

### 1) Structure de la molécule d'Hb

La molécule d'Hb a pour fonction d'assurer le transport de l'oxygène dans l'organisme. C'est une protéine tétramérique constituée de 4 sous-unités de globine semblables 2 à 2. Les chaînes de globine appartiennent, pour les unes, à la famille  $\alpha$  et pour les autres, à la famille  $\beta$ . Chaque globine a une structure globulaire compacte ménageant une poche dans laquelle vient se nicher une molécule d'hème (figure 1). Il s'agit d'une protoporphyrine maintenant en son centre un atome de fer sous forme réduite ( $\text{Fe}^{++}$ ) qui permet de fixer l'oxygène.

Figure 1: schéma de la molécule d'Hb

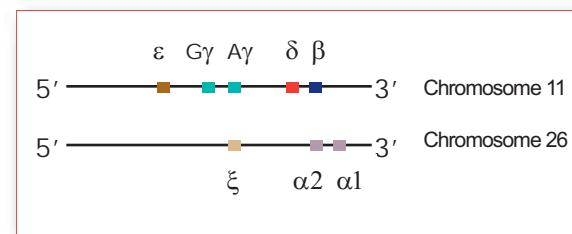


### 2) Les gènes de l'Hb

Les chaînes de type  $\alpha$  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  $\beta$  (auxquelles se rattachent les chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ ) comportent 146 résidus et dépendent de gènes situés sur le chromosome 11. L'organisation des familles des gènes de globine est présentée schématiquement figure 2. Leur expression est coordonnée précisément pour aboutir à une synthèse équivalente des gènes de la famille  $\alpha$  et de la famille  $\beta$ , tout déséquilibre se traduisant par un syndrome thalassémique.

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



### 3) Les différentes Hb humaines

Différentes Hb se succèdent et se chevauchent au cours des étapes de la vie (figure 3) : il en existe toujours plusieurs simultanément. Elles se distinguent par la nature des chaînes qui les constituent.

Les gènes  $\epsilon$  et  $\zeta$  s'expriment uniquement pendant la vie embryonnaire. La chaîne  $\alpha$  est présente pendant la vie fœtale et adulte.

Le remplacement progressif des chaînes  $\gamma$  (prépondérantes pendant la vie fœtale) par les chaînes  $\delta$  et  $\beta$  s'effectue pendant les 6 premiers mois de vie.

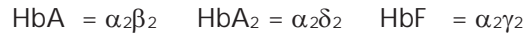
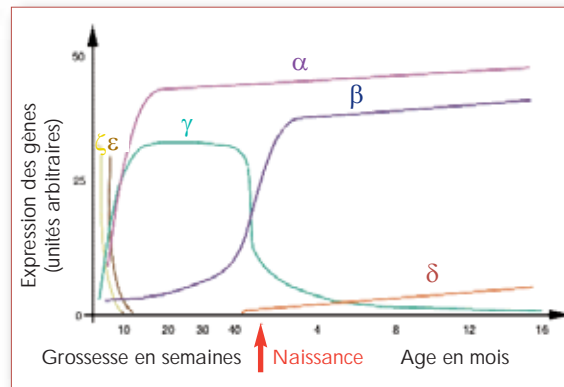


Figure 3 : expression des gènes de globine au cours du développement



## LES HEMOGLOBINOPATHIES

### 1) Types d'hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies sont de deux types :

- 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 des chaînes  $\alpha$  et/ou  $\beta$ , 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 groupes puisque certaines Hb de structure anormale se comportent comme des variants thalassémiques. D'autre part, il n'est pas rare que les deux types d'anomalies soient présents chez un même individu.

### 2) Variants fréquents

Plus de 1000 variants sont aujourd'hui répertoriés dans la banque de données HbVar accessible sur le web :

<http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/menu.html>

Seuls 1/3 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 :

**1] Les variants 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 ;

**2] 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 ;

**3] 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 variants doivent être caractérisés et rapportés dans les banques de données pour éviter qu'ils ne soient confondus avec des variants aux conséquences cliniques sévères ;

**4] les variants exceptionnels à l'origine de désordre hématologiques variés :** Hb instables (qui sont la cause d'anémies hémolytiques chroniques), Hb hyperaffines (responsables de polyglobulies), Hb hypo-affines (responsables d'anémies avec cyanose), HbM (cause de méthémoglobinémies).

### ● HbS

L'HbS est un mutant de la chaîne  $\beta$  où l'acide glutamique en position 6 est remplacé par une valine. Elle définit la drépanocytose, maladie génétique à transmission autosomique récessive.

### Répartition géographique

L'HbS est fréquente chez les sujets originaires d'Afrique noire (jusqu'à 25 % de la population dans certaines régions) et également retrouvée aux Antilles (10-12 %), au Maghreb, en Sicile, en Grèce, dans tout le Moyen-Orient et aux Indes.

### Diagnostic biologique et clinique

L'HbS est détectée par les techniques électrophorétiques et/ou chromatographiques, un seul test n'étant pas suffisant pour affirmer son existence. Il est recommandé de confirmer sa présence par des tests fonctionnels (test de solubilité,

test de falciformation) pour différencier l'HbS des autres variants migrant ou coéluant en même temps. Le dosage précis des différentes fractions est indispensable pour affiner le diagnostic. Le taux d'HbA<sub>2</sub> mesuré par CL-EC (Chromatographie Liquide-Echange de Cations) peut être légèrement augmenté chez un porteur d'HbS en raison de la présence de dérivés de l'HbS pouvant

coéluier avec l'HbA<sub>2</sub>. Le tableau I résume les caractéristiques cliniques et biologiques des différentes formes de drépanocytose. Les formes sévères, appelés syndromes drépanocytaires majeurs, associent trois grandes catégories de manifestations cliniques : anémie hémolytique chronique avec épisodes d'aggravation aigus, phénomènes vaso-occlusifs, susceptibilité aux

infections bactériennes. Ces formes nécessitent une prise en charge précoce par un centre spécialisé. Chez un hétérozygote symptomatique, une étude complémentaire est nécessaire pour rechercher une mutation supplémentaire sur les gène  $\beta$  ou  $\alpha$ , en cis ou en trans. C'est le cas pour identifier l'HbS-Antilles, pour laquelle une seconde mutation ( $\beta$  23 Val Ile) sur le gène de l'HbS favorise la polymérisation de l'Hb.

Tableau I : caractéristiques biologiques et cliniques des principaux syndromes drépanocytaires

Statut génétique	Expression clinique	Diagnostic biologique					
		Hb (g/dl)	VGM (fl)	Etude de l'Hb			
				HbA (%)	HbS (%)	HbF (%)	HbA <sub>2</sub> (%)
S hétérozygote	Asymptomatique => conseil génétique	N	N	60-65	35-40	< 1	V
S hétérozygote et $\alpha$ -thalassémie associée		N	↓ (sans carence martiale)	60-75	30 et 35 (un seul gène $\alpha$ délété) 25-30 (deux gènes $\alpha$ délétés)	< 1	V
S homozygote	Syndromes drépanocytaires majeurs -> prise en charge précoce dans des centres spécialisés	6-10	N	0	80-95	5-20*	V
Hétérozygotie composite S/C (ou S/D-Los Angeles** ou S/O-Arab)		10-12	↓ (70-90)	0	50 (+HbC, Hb D-Los Angeles**, Hb O-Arab=45)	1-7*	V
Hétérozygotie S/ $\beta^+$ -thalassémie		9-12	↓ (65-95)	1-25	55-90	5-15*	V
Hétérozygotie composite S/ $\beta^0$ -thalassémie		7-11	↓ (60-80)	0	80-90	5-15*	V
Hétérozygotie composite S/PHHF	Généralement asymptomatique => conseil génétique	N	N	0	≥ 70	15-35*	V

N : normal

\* : 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.

V : variable car le dosage de l'HbA<sub>2</sub> peut être l'objet d'une contamination par des fractions dérivées de l'HbS

\*\* : HbD-Los Angeles est aussi appelé D-punjab



Dans les syndromes drépanocytaires majeurs, l'existence d'une  $\alpha$ -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.

### Conseil génétique

La présence d'HbS chez des parents asymptomatiques doit donc être prise en compte dans le conseil génétique de la drépanocytose. Ces couples doivent être informés du risque de syndrome drépanocytaire majeur dans leur descendance.

Tableau II : caractéristiques biologiques et cliniques des hémoglobinoses C

Statut génétique	Expression clinique	Diagnostic biologique				
		NFS	Etude de l'Hb			
			HbA (%)	HbC (%)	HbF (%)	HbA <sub>2</sub> (%)
Hémoglobinoses C hétérozygote	Asymptomatique	Normale, parfois discrètement microcytaire	60-65	35-40	< 1	< 3
Hémoglobinoses C hétérozygote et $\alpha$ -thalassémie associée		Microcytose sans carence martiale associée	60-75	30 et 35 (1 seul gène $\alpha$ délété) 25-30 (2 gènes $\alpha$ délétés)	< 1	< 3
Hémoglobinoses C homozygote	Anémie hémolytique chronique modérée <u>Mécanisme</u> : cristallisation de l'HbC -> déshydratation cellulaire et moindre déformabilité des hématies	Anémie (Hb > 8g/dl) microcytaire CCMH $\uparrow$ (38 %) cellules cibles++ microsphérocytes	0	> 90	< 3	< 3
Hétérozygotie composite C/ $\beta^0$ -thalassémie	Thalassémie intermédiaire	Anémie (7-10 g/dl) microcytaire cellules cibles++ microsphérocytes	0	> 90	2-10	< 3
Hétérozygotie C/ $\beta^+$ -thalassémie	Anémie hémolytique chronique modérée	Anémie modérée microcytaire cellules cibles++ microsphérocytes	20-30	60-80	2-10	< 3

### ● HbC

L'HbC est un variant de la chaîne  $\beta$  où l'acide glutamique en position 6 est remplacé par une lysine. Elle définit l'hémoglobinoses C.

### Répartition géographique

C'est un variant caractéristique de l'Afrique de l'Ouest (jusqu'à 20 % de la population dans certaines régions), présent également aux Antilles (3 %).

### Diagnostic biologique et clinique

Le tableau II résume les caractéristiques cliniques et biologiques des différentes formes génétiques de l'hémoglobinoses C. La présence exclusive d'HbC chez un individu est à l'origine d'une anémie hémolytique chronique généralement modérée.

### Conseil génétique

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 dans leur descendance.

## ● HbE

L'HbE est un mutant de la chaîne  $\beta$  où l'acide glutamique en position 26 est remplacé par une lysine. Elle définit l'hémoglobine E. C'est sans doute la plus fréquente des Hb anormales au niveau mondial. L'HbE constitue un modèle particulier de  $\beta^+$ -thalassémie. La mutation

démontre un site d'épissage alternatif qui conduit à une synthèse avortée pour une partie de la chaîne  $\beta$  mutée. 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  $\beta$  mutées sont en trop faible quantité pour se lier aux chaînes  $\alpha$  disponibles et conduisent à un tableau  $\beta^+$ -thalassémie.

## 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.

Tableau III : caractéristiques biologiques et cliniques de l'hémoglobine E

Statut génétique	Expression clinique	Diagnostic biologique				
		NFS	Etude de l'Hb			
			HbA (%)	HbE (%)	HbF (%)	HbA <sub>2</sub> (%)
Hémoglobine E hétérozygote	Asymptomatique -> thalassémie mineure	Normale ou microcytose ou discrète anémie	70-75	25-30	< 1	*
Hémoglobine E hétérozygote et $\alpha$ -thalassémie associée	Asymptomatique => conseil génétique	Microcytose discrète anémie	80-75	20 et 25 (un seul gène $\alpha$ délété) < 20 (deux gènes $\alpha$ délétés) < 10 (trois gènes $\alpha$ délétés)	< 1	*
Hémoglobine E homozygote	Asymptomatique -> thalassémie mineure	Normale ou pseudolopoglobulie microcytaire hypochrome ou anémie microcytaire hypochrome modérée	0	> 85**	< 15**	*
Hétérozygotie composite E/ $\beta^0$ -thalassémie	Thalassémie intermédiaire	Anémie (7-10 g/dl) microcytaire cellules cibles++ microsphérocytes	0	40-60	30-60	*
Hétérozygotie E/ $\beta^+$ -thalassémie		Anémie modérée microcytaire cellules cibles++ microsphérocytes	10	> 40	30-60	*

\*: en CL-EC, l'HbE coélue avec l'HbA<sub>2</sub>, celle-ci n'est pas dosable

\*\* : 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/ $\beta^0$ -thalassémie et proposer un diagnostic moléculaire.

## Diagnostic biologique et clinique

Le tableau III résume les caractéristiques cliniques et biologiques des différentes formes génétiques de l'hémoglobinose E.

## Conseil génétique

La présence d'HbE doit donc être prise en compte dans le conseil génétique de la drépanocytose. Les couples risquant d'avoir un enfant avec une hémoglobinopathie SE doivent être informés du risque de syndrome drépanocytaire dans leur descendance.

## 3) Les thalassémies

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

d'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  $\alpha$ -thalassémies ;
- les  $\beta$ -thalassémies ;
- les  $\delta\beta$ -thalassémies (atteinte des chaînes  $\delta$  et  $\beta$ ) ;
- les  $\delta$ - et  $\gamma$ -thalassémies (sans effet clinique).

Si les  $\alpha$ -thalassémies sont les plus répandues, les  $\beta$ -thalassémies sont responsables des tableaux cliniques les plus sévères.

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 ;

*NB : les  $\beta^+$ -thalassémies particulièrement peu graves sont souvent désignées par  $\beta^{++}$ .*

La présentation clinique des thalassémies est très variable, allant de l'absence de manifestation (thalassémies mineures) à l'anémie profonde et létale dans les premières années de vie (thalassémies majeures) : tableau IV

Le dépistage des thalassémies mineures est essentiel pour informer du risque d'avoir un enfant homozygote malade.

## ● $\alpha$ -thalassémies

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

La classification des anomalies est la suivante :

- expression d'un seul gène  $\alpha$  sur le chromosome =>  $\alpha^+$ -thalassémie
- absence d'expression des deux gènes  $\alpha$  sur le chromosome =>  $\alpha^0$ -thalassémie

Dans les  $\alpha$ -thalassémies, les chaînes  $\beta$  (ou  $\gamma$  chez le nouveau-né) sont en excès et s'associent en tétramères nommés HbH ( $\beta_4$ ) ou Hb Bart's ( $\gamma_4$ ). Ces hémoglobines instables sont à l'origine d'une anémie hémolytique.






Le tableau V résume les caractéristiques cliniques et biologiques des  $\alpha$ -thalassémies.

Tableau IV : classement des thalassémies en formes majeures, mineures ou intermédiaires

	Tableau clinique	Anomalies moléculaires
<b>Thalassémies mineures (trait thalassémique)</b>	Asymptomatique	- $\beta$ -thalassémies hétérozygotes - $\delta\beta$ -thalassémies hétérozygotes - $\alpha$ -thalassémies (1 ou 2 gènes $\alpha$ non fonctionnels)
<b>Thalassémies majeures</b>	Associées à des degrés variables d'hémolyse sévère, érythropoïèse inefficace et surcharge en fer => transfusions sanguines régulières nécessaires	Les deux gènes $\beta$ sont atteints par une lésion thalassémique grave
<b>Thalassémies intermédiaires</b>	Expression clinique et hématologique plus sévère que celle d'une thalassémie mineure sans toutefois atteindre celle d'une thalassémie majeure => transfusions sanguines exceptionnelles mais le sujet est exposé à de nombreuses complications liées à la dysérythropoïèse	- homozygoties ou hétérozygoties composites pour des mutations avec synthèse réduite des deux chaînes $\beta$ - hémoglobinose H (3 gènes $\alpha$ non fonctionnels)



Tableau V : caractéristiques cliniques et biologiques des  $\alpha$ -thalassémies

Nombre de gènes $\alpha$ atteints (■)	Désignation	Tableau clinique	Tableau biologique NFS	Etude de l'Hb	Anomalies moléculaires	Répartition géographique et fréquence
1 	$\alpha^+$ -thalassémie ( $-\alpha/\alpha\alpha$ )	Asymptomatique => thalassémie silencieuse	Normale ou discrète microcytose ou discrète anémie microcytaire hypochrome	Normale chez l'adulte 1 % d'Hb Bart's à la naissance	- généralement : délétion totale ou partielle du gène $\alpha 2$ - plus rarement : mutation ponctuelle sur un gène $\alpha$	Anomalie génétique la plus répandue dans le monde : - Afrique : porteurs hétérozygotes -> 1/4 population - Bassin méditerranéen, sud-est asiatique, Inde (40 % de la population).
2 	$\alpha^0$ -thalassémie hétérozygotie ( $--/\alpha\alpha$ )	Bien tolérée -> thalassémie mineure => conseil génétique pour les $\alpha^0$ -thalassémies hétérozygotes des sujets asiatiques	Pseudopolyglobulie microcytaire hypochrome	Normale chez l'adulte 5 à 10 % d'Hb Bart's à la naissance	- généralement : délétion des deux gènes $\alpha$ en cis	Fréquente en Chine, dans le sud-est asiatique et sur le pourtour du bassin méditerranéen.
	$\alpha^+$ -thalassémie homozygote ( $-\alpha/-\alpha$ )		Microcytose +/- discrète anémie		- généralement : délétion des deux gènes $\alpha 2$ en trans	Fréquente en Afrique : porteurs homozygotes -> 1 à 2 % de la population
=> <b>DIAGNOSTIC DES FORMES MINEURES</b>						
-> diagnostic évoqué devant une microcytose non expliquée par une $\beta$ - ou $\delta\beta$ -thalassémie (taux d'HbA <sub>2</sub> et F normaux) ou une carence martiale						
-> diagnostic de certitude : étude moléculaire, envisagée uniquement dans le cadre du conseil génétique						
3 	Hémoglobinoïse H ( $-\alpha/-\alpha$ par exemple)	Plus ou moins bien tolérée : thalassémie intermédiaire => conseil génétique	Anémie hémolytique avec microcytose et hypochromie Hb = 3 à 10 g/dl	- 1 à 40 % d'Hb H chez l'adulte - HbA <sub>2</sub> (1 à 2 %) - HbF parfois (1 à 3 %) - 20 à 40 % d'Hb Bart's à la naissance	- différentes anomalies génétiques dont la plus fréquente est la forme $--/-\alpha$ , résultant d'une hétérozygotie composite $\alpha^0$ -thalassémie / $\alpha^+$ -thalassémie - la caractérisation moléculaire est indiquée pour approcher la sévérité de la maladie	Fréquente en Chine et dans le sud-est asiatique -> rarement rencontrée en France, concernent des sujets asiatiques ou plus rarement originaires des pays du bassin méditerranéen.
4 	$\alpha^0$ -thalassémie homozygote ( $--/--$ )	Mort fœtale <i>in utero</i> dans un tableau d'hydrops fœtal avec anasarque foetoplacentaire		Etude moléculaire indispensable	4 gènes $\alpha$ non fonctionnels	Sud-est asiatique, Chine, bassin méditerranéen

## ● $\beta$ -thalassémies

### Répartition géographique

Les  $\beta$ -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.

### Génotype et phénotype

Le tableau VI résume les caractéristiques cliniques et biologiques des  $\beta$ -thalassémies.

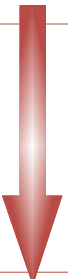
Les anomalies moléculaires sont le plus souvent des mutations ou de courtes délétions ou insertions, limitées à quelques nucléotides. Plus de 200 lésions différentes ont été décrites mais une dizaine seulement est responsable de 80 % des cas. Lors du typage d'une mutation, l'origine géographique du patient est un élément d'orientation important car chaque zone géographique présente un spectre de mutations caractéristique.

Tableau VI : caractéristiques cliniques et biologiques des  $\beta$ -thalassémies

Statut génétique	Tableau clinique	Diagnostic biologique		
		NFS	Etude de l'Hb	Remarques
$\beta$ -thalassémies hétérozygotes	Asymptomatique => conseil génétique	Microcytose isolée ou pseudopolyglobulie microcytaire hypochrome ou, plus rarement, légère anémie microcytaire	- $\uparrow$ HbA <sub>2</sub> (4 à 5 %) - $\uparrow$ HbF associée (2 à 7 %) dans 30 à 50 % des cas  <i>Remarque :</i> Taux d'HbA <sub>2</sub> et F dépendant du type d'anomalie génétique en cause	Causes susceptibles d'abaisser le taux d'HbA <sub>2</sub> et de masquer une $\beta$ -thalassémie mineure : - carence en fer -> renouveler l'étude de l'Hb si la microcytose persiste après avoir corrigé la carence martiale ; - grossesse : devant une NFS évocatrice, il est recommandé de faire une étude de l'Hb chez le conjoint ; - période néonatale : pendant cette période, le taux d'HbA <sub>2</sub> est bas et le diagnostic n'est pas possible ; - plus rarement : $\delta$ -thalassémie associée en cis ou en trans diminuant le taux d'HbA <sub>2</sub> ; - carence en folates.
$\beta$ -thalassémies intermédiaires	Définition clinique : expression plus sévère que celle d'une thalassémie mineure sans toutefois atteindre celle d'une thalassémie majeure => transfusions sanguines exceptionnelles => conseil génétique	Anémie microcytaire (Hb entre 6 et 9 g/dl)	- $\uparrow$ HbF - $\uparrow$ HbA <sub>2</sub> - HbA absente ou $\downarrow$  <i>Remarque :</i> Taux variables en fonction du type d'anomalies moléculaires en cause -> doit être complétée par des techniques de biologie moléculaire qui précisent la nature des anomalies et permettent de rechercher une $\alpha$ -thalassémie associée.	Sur le plan moléculaire, on retrouve : - homozygoties ou hétérozygoties composites pour des thalassémies peu graves (exemple : HbE/ $\beta$ -thalassémie) ; - thalassémie majeure dont l'expression est atténuée par une autre anomalie (exemple : synthèse élevée d'HbF) ; - association aggravant une atteinte hétérozygote (exemple : triplification $\alpha$ aggravant une $\beta$ -thalassémie) ; - association thalassémie/Hb instable.
$\beta$ -thalassémies majeures	Anémie apparaissant au cours des premiers mois de vie -> évolution fatale en l'absence de transfusions sanguines	Anémie microcytaire hypochrome (Hb < 7 g/dl)	- $\uparrow\uparrow$ HbF - HbA <sub>2</sub> normale ou $\uparrow$ - HbA : absente dans les $\beta^0$ -thalassémies, $\downarrow\downarrow$ dans les $\beta^+$ -thalassémies.	

Dans les  $\beta$ -thalassémies, le défaut de chaînes  $\beta$  est responsable d'un excès de chaînes  $\alpha$ , incapables de s'associer entre elles et extrêmement instables. Elles sont responsables d'une érythropoïèse inefficace. C'est le déséquilibre de synthèse entre chaînes qui augmente de façon croissante la sévérité du phénotype (figure 4). Les modificateurs secondaires du phénotype sont les autres gènes de globine dont l'expression interagit avec celle du gène  $\beta$  anormal. Il s'agit essentiellement des gènes  $\alpha$  et  $\gamma$ . Ainsi, une  $\alpha$ -thalassémie mineure associée à une  $\beta$ -thalassémie mineure en diminue l'expression. A l'inverse, une triplification des gènes  $\alpha$  en majore l'expression.

Figure 4 : conséquence du rapport de synthèse  $\beta/\alpha$  sur le phénotype thalassémique

Phénotype	Rapport de synthèse $\beta/\alpha$	Génotype
Thalassémie silencieuse	1	$\beta^{++}/\beta^N$
Trait thalassémique		$\beta^{++}/\beta^{++}$
		$\beta^{+}/\beta^N$
		$\beta^{\circ}/\beta^N$
		$\beta^{+}/\beta^{++}$
Thalassémie intermédiaire	0	$\beta^{+}/\beta^{+}$
Thalassémie majeure		$\beta^{\circ}/\beta^{\circ}$

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

Les  $\delta\beta$ -thalassémies résultent de la délétion des deux gènes  $\delta$  et  $\beta$ . Elles s'observent chez différentes ethnies du bassin méditerranéen. La PHHF peut résulter de plusieurs types d'anomalies moléculaires.

On distingue :

- les **PHHF délétionnelles** qui résultent de délétions larges incluant les gènes  $\delta$  et  $\beta$  ;
- 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.

#### ● $\delta$ -thalassémies

Les  $\delta$ -thalassémies n'ont pas de signification clinique. Elles se traduisent par une diminution du taux d'HbA<sub>2</sub> avec une NFS normale. Leur association, en cis ou en trans, avec un gène  $\beta$ -thalassémique a pour conséquence la non élévation du taux d'HbA<sub>2</sub>, ce qui peut faire méconnaître le trait thalassémique.

Tableau VII : principales caractéristiques biologiques et cliniques des  $\delta\beta$ -thalassémies et PHHF

Statut génétique	Tableau clinique	Diagnostic biologique	
		NFS	Etude de l'Hb
Hétérozygotie $\delta\beta$ -thalassémie	Thalassémie mineure	Paramètres hématologiques similaires à ceux observés dans une $\beta$ -thalassémie mineure (microcytose)*	- HbF $\uparrow$ (5 à 20 %) - HbA <sub>2</sub> normale le plus souvent, parfois diminuée
Homozygotie $\delta\beta$ -thalassémie	Thalassémie intermédiaire	Hb = 8 à 13 g/dl microcytose	- 100 % d'HbF - Absence d'HbA
Hétérozygotie composite $\delta\beta$ -thalassémie/ $\beta$ -thalassémie			- HbF $\uparrow\uparrow$ - HbA $\downarrow\downarrow$
Hétérozygotie PHHF	Asymptomatique	Paramètres hématologiques normaux (normocytose)*	- HbF élevé (15 à 30 %) - HbA <sub>2</sub> normale le plus souvent
Homozygotie PHHF		Pseudopolyglobulie microcytaire hypochrome	- 100 % d'HbF - Absence d'HbA
Hétérozygotie composite PHHF/ $\beta$ -thalassémie	Syndrome thalassémique peu sévère à intermédiaire	Anémie microcytaire	- HbF 70 % - HbA <sub>2</sub> normale le plus souvent

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

## ETUDE DE L'HEMOGLOBINE

### 1) Circonstances de prescription

- Dépistage systématique dans les ethnies à risque (conseil génétique en vue d'une grossesse, bilan préopératoire ...)
- Recherche d'une hémoglobinopathie devant une anomalie de l'héogramme (microcytose, anémie, pseudopolyglobulie)
- Antécédents familiaux
- Suivi d'une hémoglobinopathie connue
- Découverte fortuite d'un variant de l'Hb lors du dosage d'HbA<sub>1c</sub>.

### 2) Conditions nécessaires à l'interprétation des résultats

L'interprétation des résultats doit tenir compte de différentes données :

- âge du patient
- origine ethnique
- contexte familial

- contexte clinique
- contexte transfusionnel (il est indispensable de faire l'analyse à distance d'une transfusion, 3 mois minimum)
- constantes érythrocytaires (cf tableau VIII : normes en fonction de l'âge)
- bilan martial (incontournable en cas de microcytose)
- bilan d'hémolyse en cas d'anémie (réticulocytes, haptoglobine, bilirubine).

### 3) Prélèvement

Généralement, 5 ml de sang sur anticoagulant (EDTA le plus souvent) suffisent pour une étude classique. L'échantillon réfrigéré peut se conserver au maximum 8 jours.

### 4) Valeurs normales

- HbA > 95,6 %
- HbA<sub>2</sub> = 2 à 3,5 % (valeur indicative, à déterminer en fonction de chaque technique)
- HbF < 1%

### 5) Techniques

Malgré la très grande diversité des anomalies en cause sur le plan génétique, le diagnostic est généralement porté sur le seul phénotype.

L'étude de l'Hb nécessite d'avoir recours à des méthodes de séparation et de quantification des différentes fractions de l'hémoglobine :

-> Le dépistage des thalassémies mineures requiert une quantification précise des taux d'HbA<sub>2</sub> et F

-> La détection et l'identification des variants de l'Hb nécessitent le recours à des méthodes suffisamment résolutive.

La pratique d'une seule technique n'est pas recommandée pour deux raisons principales :

- un profil normal, quelque 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.

Le dépistage des porteurs sains permet d'identifier des couples à risque de donner naissance à un enfant malade afin de proposer un conseil génétique et, éventuellement, un diagnostic anténatal. Celui-ci est réalisable à partir de l'ADN foetal isolé des cellules amniotiques, de biopsie de placenta ou de villosités chorales.

La caractérisation préalable des mutations chez les parents est indispensable pour les  $\beta$ -thalassémies en raison du grand spectre de mutations. Elle est également indispensable dans le cas de la drépanocytose pour sécuriser le résultat.

Le tableau IX résume les caractéristiques des différentes techniques d'étude de l'Hb.

Tableau VIII : indices érythrocytaires en fonction de l'âge et du sexe

Age	Hb (g/dl)	Hématies (T/l)	VGM (fl)	TCMH (pg)
6 mois -2 ans	12 $\pm$ 0,9	4,66 $\pm$ 0,3	76,1 $\pm$ 3,2	25,7 $\pm$ 1,4
2-6 ans	12,2 $\pm$ 0,7	4,67 $\pm$ 0,3	77,6 $\pm$ 3,3	26,3 $\pm$ 1,3
6-12 ans	12,7 $\pm$ 0,8	4,68 $\pm$ 0,3	80,4 $\pm$ 3,4	27,3 $\pm$ 1,3
12-16 ans	13,5 $\pm$ 1,1	4,74 $\pm$ 0,4	83,8 $\pm$ 4	29,2 $\pm$ 1,5
Adulte femme	11,5 à 15	4 à 5	82 à 98	27 à 32
Adulte homme	13 à 17	4,5 à 5,5		

## 6) Nomenclature des actes de biologie médicale (janvier 2010)

### ● Chapitre "Hématologie"

- 1113 (B60) : **Electrophorèse de l'hémoglobine** en gel de polyacrylamide

- 1114 (B60) : **Electrophorèse de l'hémoglobine** en citrate agar

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

- 1115 (B30) : **Test de solubilité de l'hémoglobine** (test d'ITANO) en vue de la confirmation d'une HbS

- 1117 (B20) : **Test à l'isopropanol** en vue de la recherche d'une hémoglobine instable

- 1118 (B20) : **Dosage de l'hémoglobine F**

- 1120 (B120) : **Recherche d'une anomalie de l'hémoglobine** par au moins une technique d'électrophorèse, et deux autres tests adaptés selon les besoins pour un résultat diagnostique d'orientation.

Un commentaire et un résultat accompagnent le compte-rendu.

### ● Chapitre "Diagnostic prénatal"

#### Anomalies de l'hémoglobine

- 4054 (B600) : diagnostic prénatal d'une drépanocytose par biologie moléculaire

- diagnostic prénatal d'une  $\beta$ -thalassémie majeure :  
· recherche de mutations les plus fréquentes dans la population, de même origine géographique

- 4055 (B400) : deux mutations
- 4056 (B600) : plus de deux mutations
- si les recherches précédentes n'ont identifié qu'une ou aucune mutation : étude indirecte par analyse de la ségrégation de polymorphismes de l'ADN : 4057 (B700)

Ces analyses s'entendent par individu étudié. Elles ne sont pas cumulables.

- diagnostic prénatal d'une  $\alpha$ -thalassémie :
  - 4058 (B500) : avec antécédents familiaux connus
  - 4059 (B700) : sans antécédents familiaux

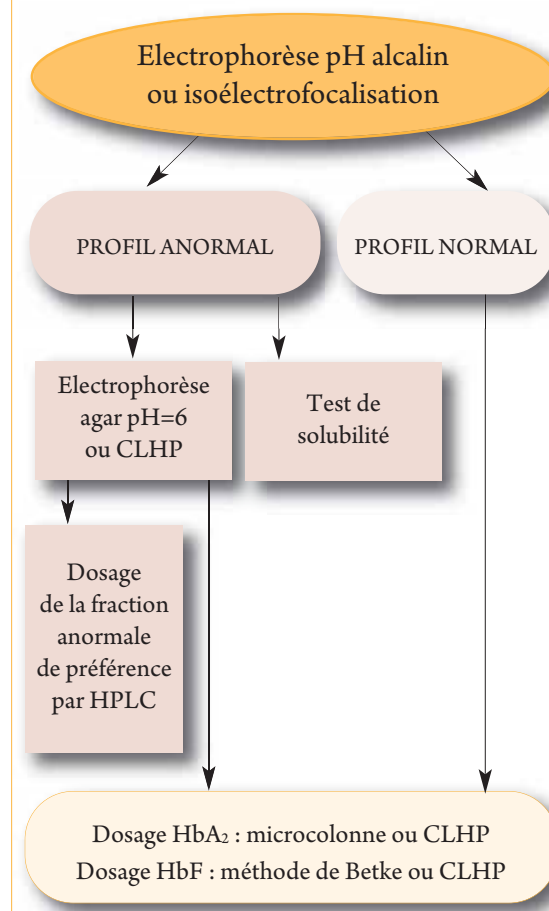
## 7) Recommandations de la Société Française de Biologie Clinique (S.F.B.C.)

En 2003, la SFBC, par l'intermédiaire de son groupe de travail «Recommandations dans le domaine des diagnostics des hémoglobinopathies» a publié un recueil de « bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine». Il est proposé une démarche standardisée et actualisée afin d'obtenir des diagnostics fiables en vue de la prise en charge des patients, du conseil génétique et du diagnostic anténatal (cf fig.5 in BARDKAJIAN-MICHAU J. & Groupe de travail de la SFBC Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. Ann Biol Clin 2003, 61 : 401-9).

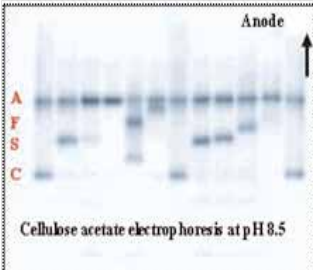
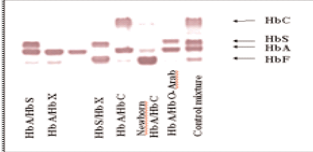
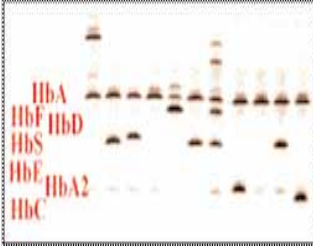
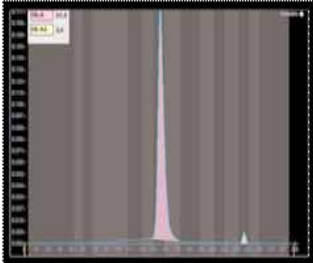
Il est notamment rappelé que les techniques d'électrophorèse en gel ne sont pas adaptées à la quantification des fractions mineures, HbA<sub>2</sub> et F. D'autre part, la pratique d'une seule technique n'est pas recommandable car un profil normal, quelque soit le système utilisé, ne permet pas d'éliminer un mutant de l'Hb.

Il est à noter que ce travail ne prenait pas encore en compte l'essor croissant de l'électrophorèse capillaire dont les performances pour mesurer les taux d'HbA<sub>2</sub> et F sont actuellement jugées équivalentes à celles de la CL-EC.

Figure 5 : Stratégie proposée par la SFBC pour la recherche d'une anomalie de l'Hb



## 8) Caractéristiques des différentes techniques de l'étude de l'Hb (Tableau IX ci-dessous)



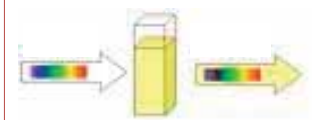
TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES					
	Principe	Intérêt	Limites	Remarques	Illustration
<b>Electrophorèse à pH alcalin sur acétate de cellulose</b>	A pH 8.5, la molécule d'Hb chargée négativement migre vers l'anode -> les hémoglobines qui ont un gain de charge positive migrent plus lentement.	Simple à mettre en œuvre	- pas suffisamment précise pour quantifier les fractions mineures, HbA2 et HbF - faible pouvoir résolutif -> impossible de distinguer des variants de même migration : HbS/D-Punjab ou HbE/HbC/HbO-Arab - mise en défaut chez le nouveau-né où l'HbF est mal séparée des HbA et HbS	Technique la plus utilisée -> 73 % des participants lors de la dernière opération de contrôle de qualité organisée par l'AFSSAPS en 2004	 Cellulose acetate electrophoresis at pH 8.5
<b>Electrophorèse sur gel d'agar à pH acide</b>	La mobilité de la molécule d'hémoglobine dépend des modifications structurales induites par la mutation dans certaines régions positivement chargées de la protéine	Contribue à l'identification des Hb anormales préalablement identifiées par l'électrophorèse à pH alcalin ou la focalisation isoélectrique	Extrêmement sensible aux conditions expérimentales -> reproductibilité difficile	La nomenclature la réserve au cas où l'électrophorèse en gel de polyacrylamide suggère la présence d'HbC ou E.	
<b>Focalisation isoélectrique sur gel d'agarose ou de polyacrylamide</b>	Utilise la différence de point isoélectrique des Hb	- Permet traiter de grandes séries - Très bonne résolution -> méthode de choix pour la détection des Hb anormales	- Technique semi automatisée, plus longue et plus complexe à mettre en œuvre que l'électrophorèse sur acétate de cellulose - Pas suffisamment précise pour quantifier les fractions mineures, HbA2 et HbF - ne différencie pas HbS/HbD/HbG/HbLepore, non plus que HbC/HbE/HbO-Arab.	Méthode utilisée pour le dépistage néonatal	
<b>Electrophorèse capillaire</b>		- Rapide - Automatisée - Performances satisfaisantes pour doser les fractions mineures, HbA2 et HbF - Bonne résolution : à l'écran, en plaçant le curseur sur le pic anormal, le logiciel indique pour chaque zone définie par le constructeur, une liste de variants potentiels	Plusieurs variants ayant le même comportement que les Hb anormales les plus courantes, il reste impératif de confronter les résultats à ceux obtenus par une autre technique	Tend à devenir une technique de choix de première intention pour l'étude de l'Hb	



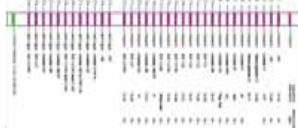
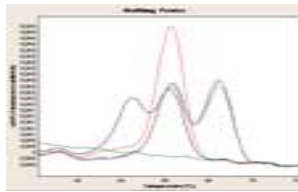
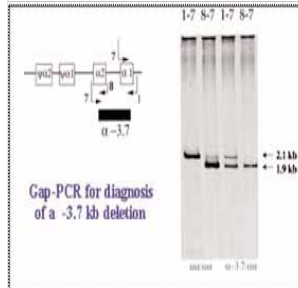

## TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

	Principe	Intérêt	Limites	Remarques	Illustration
<b>Chromatographie liquide* sur colonne échangeuse de cations (CL-EC)</b>  <b>* CLHP</b>	Les différentes fractions d'hémoglobine sont séparées par un gradient de tampons de force ionique et de pH croissants	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Automatisée et adaptée à de grandes séries</li> <li>- Calibrée -&gt; excellente précision pour le dosage des fractions HbA<sub>2</sub> et HbF</li> <li>- Identification présomptive des variants les plus courants (HbS, HbC) faite par leur temps d'élution à l'intérieur de « fenêtres » définies par le constructeur</li> </ul>	D'autres variants pouvant coéluer avec les Hb anormales les plus courantes, il reste impératif de confronter les résultats à ceux obtenus par une autre technique	Considérée par de nombreux laboratoires comme la méthode de choix pour dépister et quantifier les différentes fractions d'Hb normales et anormales (cf programmes de contrôle de qualité internationaux)	
<b>Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RT-HPLC)</b>	Etude séparative des chaînes de globine -> les chaînes polypeptidiques sont séparées en fonction de leur hydrophobicité	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contribution à la séparation et l'identification des variants rares (exemple : HbS Antilles)</li> <li>- Caractérisation des Hb fœtales (diagnostic de PHHF)</li> </ul>		Réservée aux laboratoires spécialisés pour l'étude de l'Hb	

## TESTS SPECIFIQUES

	Principe	Intérêt	Limites	Remarques	Illustration
<b>Test de solubilité (test d'ITANO)</b>	Précipitation de l'Hb S désoxygénée par du dithionite (hydrosulfite de sodium) en milieu salin concentré (tampon phosphate 2.8 M, pH 6.8).	- Très spécifique de l'HbS -> utile pour son identification	- Semi-quantitatif - Non automatisé - Ne peut pas faire la distinction entre les diverses formes génétiques de drépanocytose - Dépendant de la qualité des réactifs (disparition des trousses commerciales) - Peu sensible -> ne peut être utilisé chez le nouveau-né ou chez un sujet porteur d'un taux faible d'HbS (risque de faux négatif) - Quelques rares faux + (exemple : HbC Harlem)	Réservé à la confirmation de la présence d'HbS	 1- normal 2- sample containing HbS
<b>Test de falciformation</b>	- Consiste à sceller une goutte de sang entre lame et lamelle et à attendre que les processus oxydatifs aient suffisamment réduit la tension en oxygène pour induire une falciformation visible au microscope - Variante -> test d'EMMEL : ajout de métabisulfite de sodium pour favoriser la falciformation		- Ne peut pas faire la distinction entre les diverses formes génétiques de drépanocytose - Peu sensible - Pas complètement spécifique de l'HbS	De nos jours -> utile quand rien de plus précis n'est réalisable	
<b>Test de stabilité</b>	Incuber un hémolysat à 37°C dans un tampon contenant 17 % d'isopropanol pendant un temps insuffisant pour faire précipiter l'Hb A -> mesure spectrophotométrique du taux d'Hb précipité		- Doit être réalisé sur un prélèvement frais, conservé à 4°C depuis moins de 6 heures - Un certain nombre de variants ne sont trouvés instables qu'in vitro et ne s'accompagnent d'aucune anomalie hématologique - A l'inverse, les hémoglobines les plus instables sont détruites dans les minutes ou heures qui suivent leur biosynthèse -> leur identification nécessite généralement l'utilisation des techniques de biologie moléculaire	- Réservée aux laboratoires spécialisés pour l'étude de l'Hb - Environ 200 mutations avec stabilité diminuée ont été décrites -> seulement la moitié d'entre elles sont responsables d'anomalies cliniques	
<b>Dosage d'HbF</b>	Méthode de Betke : résistance à la dénaturation alcaline de l'HbF -> mesure spectrophotométrique	- Facile à exécuter - Précise - Reproductible (pour les taux d'HbF entre 1 et 12%) - Mesure à la fois l'HbF et sa fraction acétylée	- Sensible à toute variation des conditions expérimentales - Conduit toujours à une sous-estimation d'environ 10% du taux d'HbF - Difficile à appliquer à de grandes séries	Aujourd'hui largement remplacé par CL-EC	

**TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE (analyses soumises à la réglementation : décret n°2008-321 du 4 avril 2008)**

	Principe	Intérêt	Limites	Remarques	Illustration
<b>Reverse dot-blot</b>	Amplification par PCR et marquage d'un fragment cible d'ADN -> hybridation sur un support portant des sondes, spécifiques des principales mutations recherchées	Permet de rechercher plusieurs mutations en une seule étape d'hybridation		- Trousses commerciales destinées à l'identification des mutations $\beta$ -thalassémiques les plus fréquentes dans les principales régions du monde -> diagnostic anténatal	
<b>Méthodes d'amorçage allèle-spécifique</b>	Reposent sur le principe qu'une sonde pour PCR est d'autant plus efficace qu'elle est plus spécifique de la séquence à amplifier et qu'une sonde présentant une erreur d'appariement l'est moins	Plusieurs mutations peuvent être recherchées simultanément dans une même PCR (PCR multiplex)	- Disposer d'une batterie d'amorces spécifiques de chacune des mutations que l'on cherche à caractériser - Pour un diagnostic d'homozygotie -> s'assurer, par un test indépendant, de l'absence de la séquence normale à la position de la mutation.	Appliqué au diagnostic anténatal de drépanocytose	
<b>GAP-PCR</b>	Les sondes sont construites de façon à être complémentaires des frontières de la délétion et d'amplifier ainsi un fragment spécifique à la délétion et qui la recouvre. Dans le cas de délétions étendues, la distance entre les deux sondes est trop importante pour permettre l'amplification de l'ADN normal.	- Mise en évidence des délétions plus ou moins étendues des gènes $\alpha$ et $\beta$ - Plusieurs délétions peuvent être recherchées simultanément dans une même PCR (PCR multiplex)	- Disposer d'une batterie d'amorces spécifiques des délétions que l'on cherche à caractériser - Pour détecter la présence de la région normale chez un sujet hétérozygote, il est parfois nécessaire d'amplifier en parallèle une séquence comprise à l'intérieur des limites de la délétion - Le diagnostic des délétions dont on ne connaît pas précisément les limites doit être effectué par Southern blot	- Trousses commerciales pour le diagnostic anténatal des $\alpha$ -thalassémies - Permet le diagnostic de certaines $\delta\beta$ -thalassémies, des Hb Lepore, anti-Lepore et des PHHF délétionnelles	
<b>Séquençage des gènes</b>	Amplification sélective des gènes $\beta$ , $\alpha 1$ ou $\alpha 2$ puis séquençage	Identification des variants rares	- Pas adaptée à la détection des délétions importantes - Ne met pas en évidence les modifications post-traductionnelles (rares cas de mutations suivies d'oxydation, de désamidation de création de ponts disulfure)	Les résultats doivent toujours être comparés à ceux du phénotype	

## INTERPRETATION DES RESULTATS

Arbres décisionnels appliqués à l'interprétation des résultats de l'étude phénotypique de l'Hb, valable pour les patients > 2 ans lorsque le taux d'HbF est stabilisé :

- Profil normal (fig.6)
- Anomalies quantitatives :
  - . diminution du taux d'HbA<sub>2</sub> (fig.7)
  - . augmentation du taux d'HbA<sub>2</sub> (fig.8)
  - . augmentation isolée du taux d'HbF (fig.9)
- Anomalies qualitatives :
  - . cas simples : HbA + présence d'un variant fréquent S, E ou C (fig.10)
  - . cas complexes : absence d'HbA + présence d'un variant fréquent S, E, C ou présence d'un variant rare (fig.11)

Figure 6

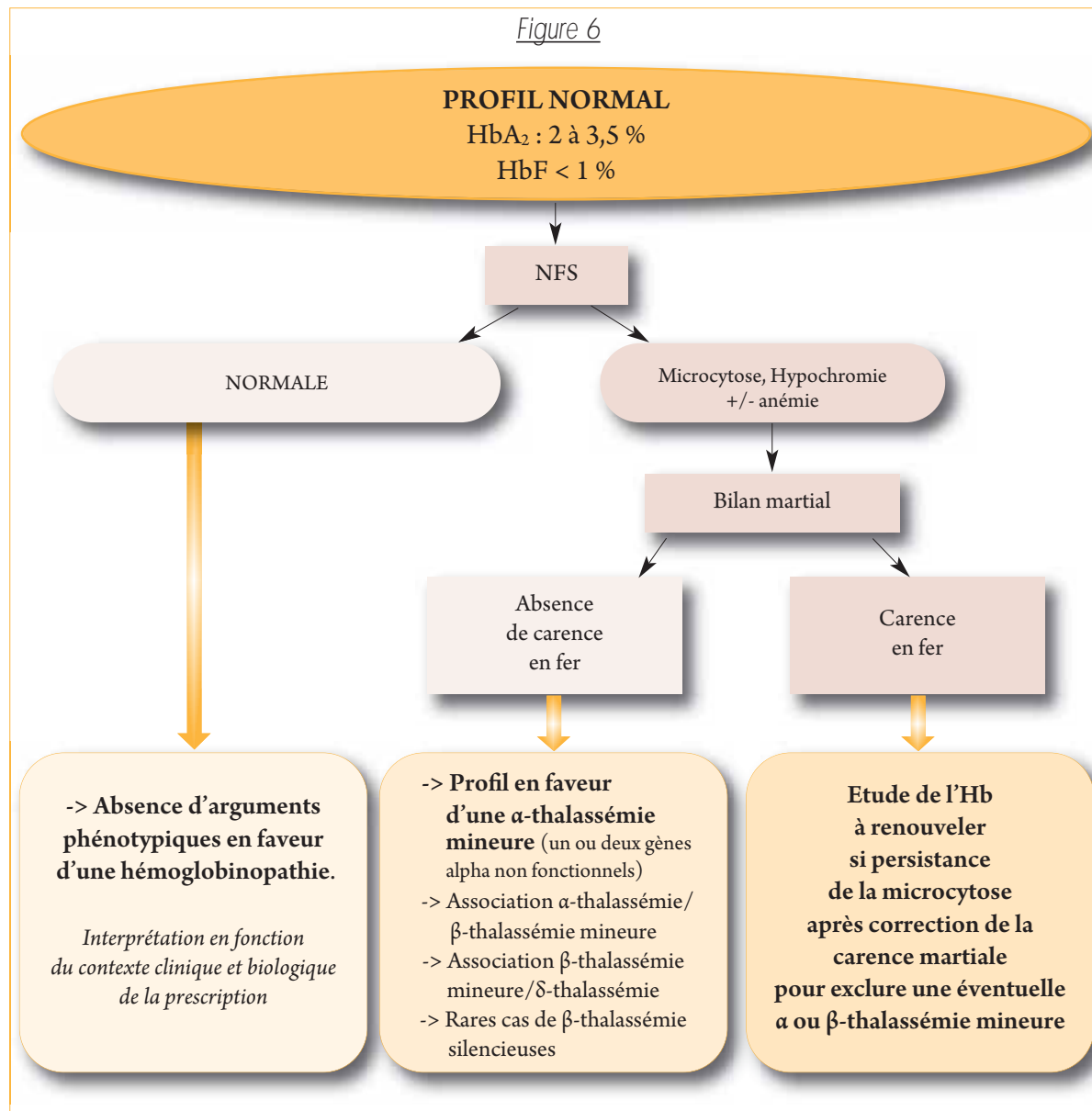


Figure 7

## DIMINUTION DU TAUX D'HbA<sub>2</sub>

HbA<sub>2</sub> < 2 % HbF < 1 %

NFS

NORMALE

Anémie microcytaire hypochrome

Bilan martial

Absence  
de carence  
en fer

Carence  
en fer

Rechercher présence d'HbH

HbH : 1 à 5 %

Absence d'HbH

->  $\delta$ -thalassémie ?  
-> Variant  $\delta$  ?

-> Hémoglobinoses H

Identification moléculaire des anomalies  
dans un laboratoire spécialisé pour  
évaluer la sévérité de la maladie

-> Diminution artéfactuelle  
de l'HbA<sub>2</sub> par  
vieillesse du  
prélèvement ?

-> Anémies sidéroblastiques  
congénitales ?

-> Diminution du taux  
d'HbA<sub>2</sub> observée au cours de  
l'anémie par carence martiale

*Etude de l'Hb à renouveler  
si persistance de la microcytose  
après correction de la carence  
martialle pour exclure  
une éventuelle  
 $\alpha$ -thalassémie mineure*

Figure 8

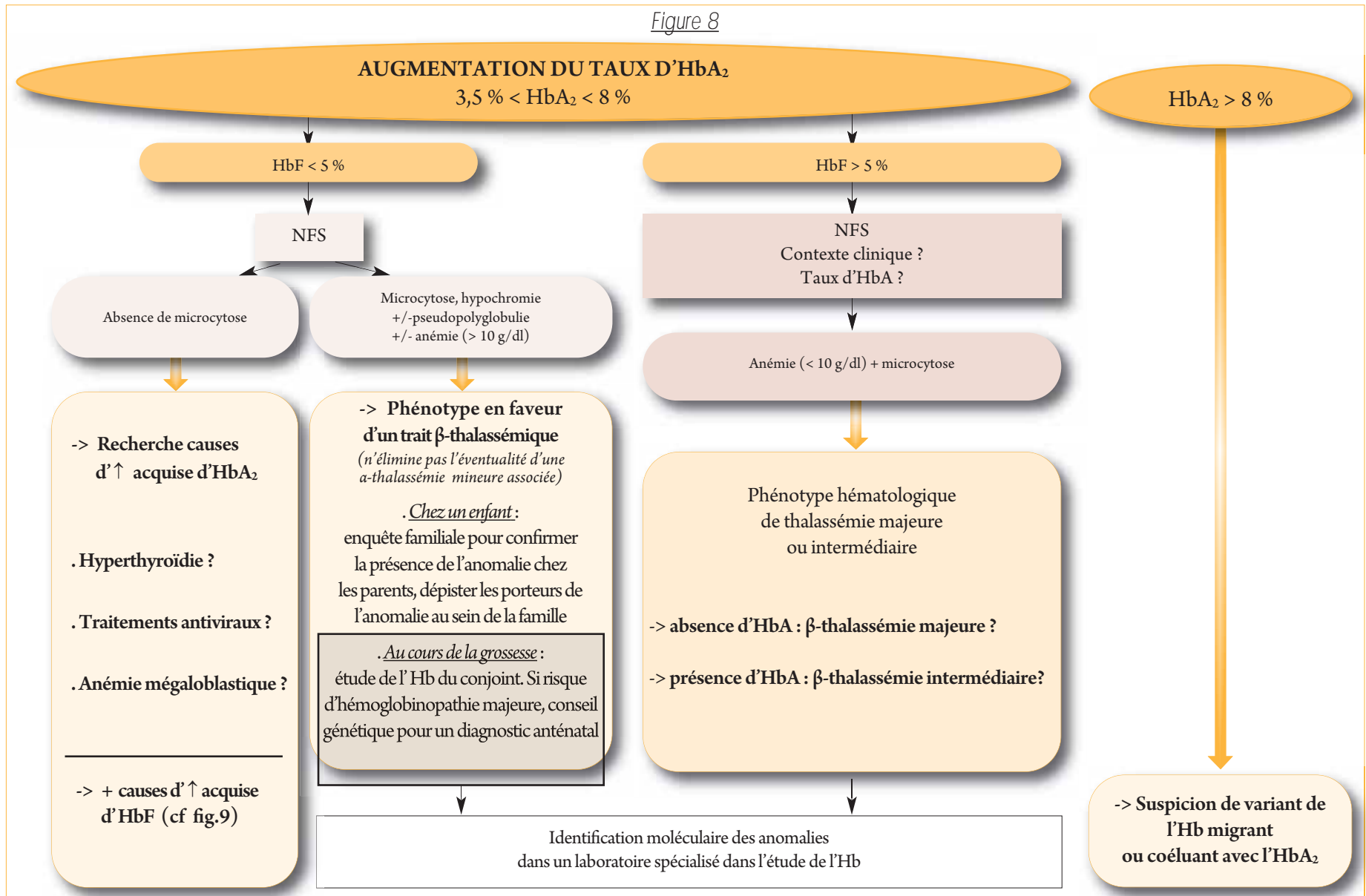




Figure 9

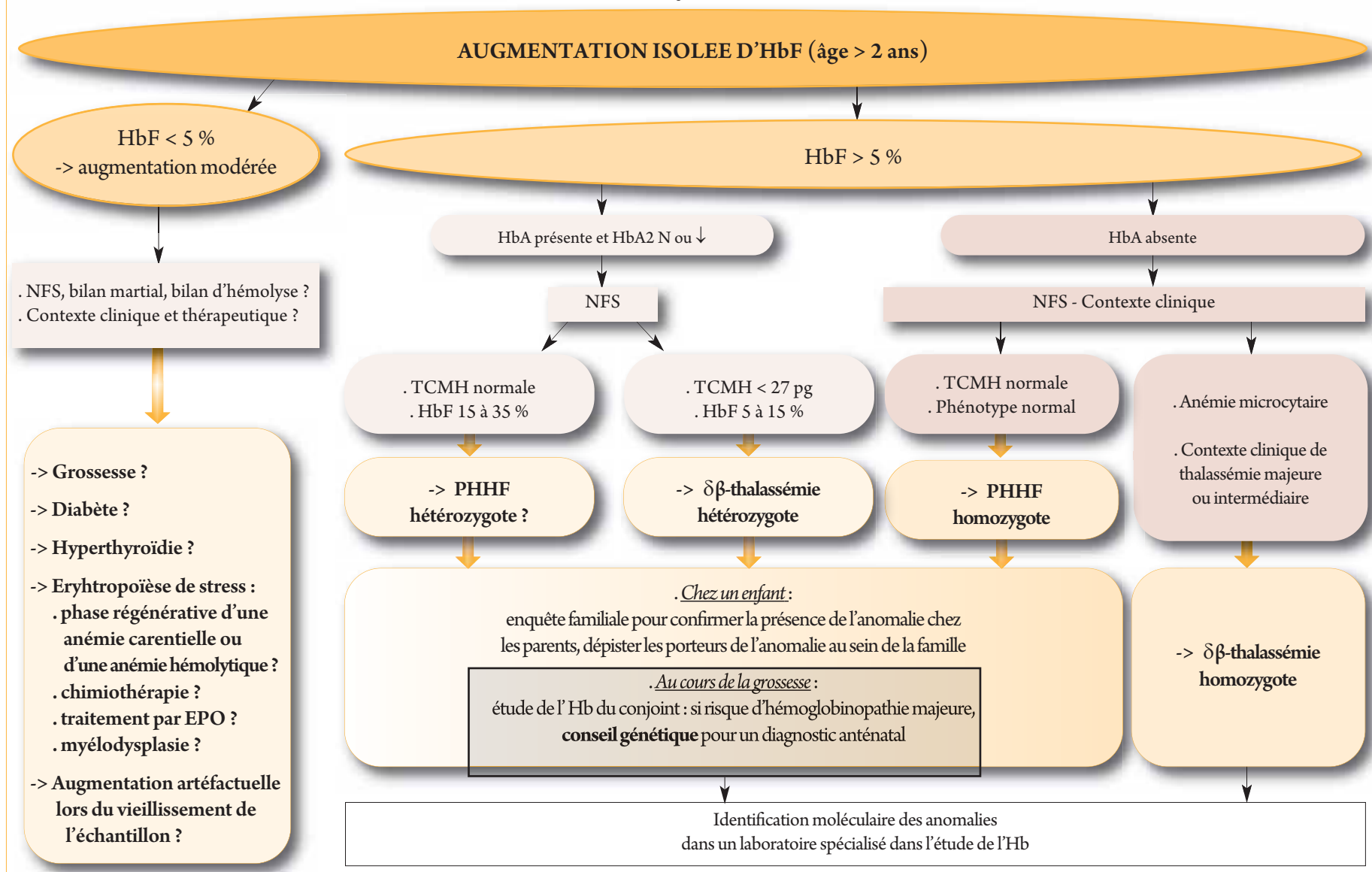


Figure 10

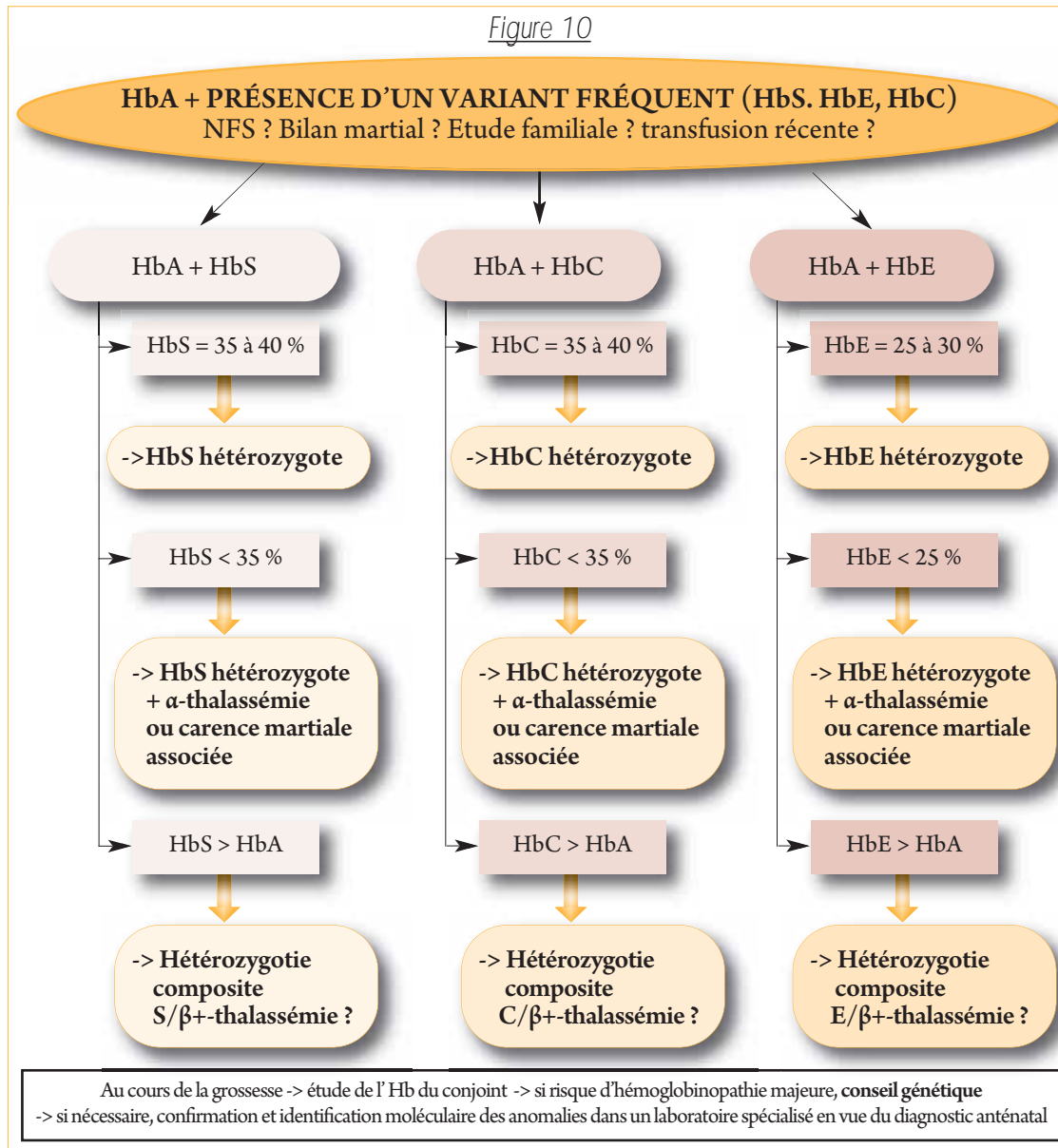
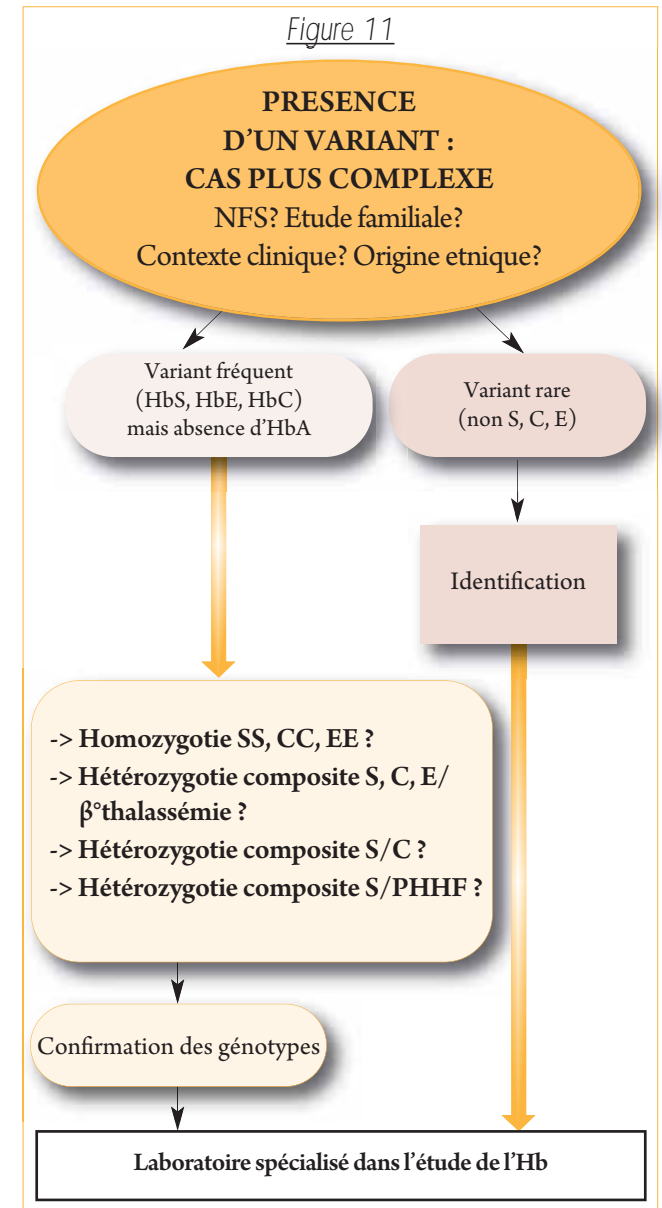


Figure 11

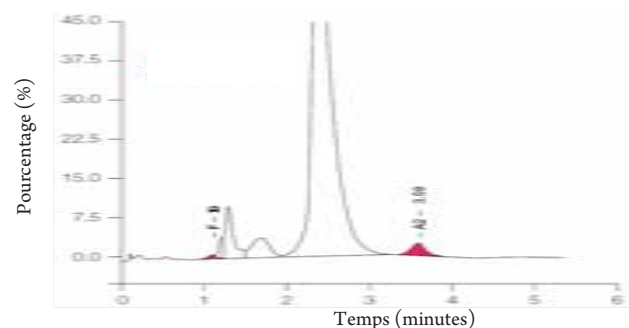


## EXEMPLES

- 1) Profil normal
- 2)  $\alpha$ -thalassémie mineure
- 3)  $\beta$ -thalassémie mineure
- 4)  $\alpha$ - et  $\beta$ -thalassémies mineures associées
- 5)  $\delta\beta$ -thalassémie mineure
- 6)  $\beta$ -thalassémie intermédiaire
- 7)  $\beta$ -thalassémie majeure
- 8) Drépanocytose hétérozygote
- 9) Drépanocytose homozygote
- 10) Hémoglobinoase H
- 11) Hb Lepore hétérozygote
- 12) Hémoglobinoase C hétérozygote
- 13) Hémoglobinoase E hétérozygote +  $\alpha$ -thalassémie
- 14) Hétérozygotie composite SC
- 15) Variant bêta : Hb D Los Angeles (D Punjab)
- 16) Variant alpha : Hb J-Broussais
- 17) Drépanocytose hétérozygote + variant alpha (Hb G-Philadelphie) +  $\alpha$ -thalassémie
- 18) Hémoglobine instable : Hb Köln

### Exemple 1 : Profil normal

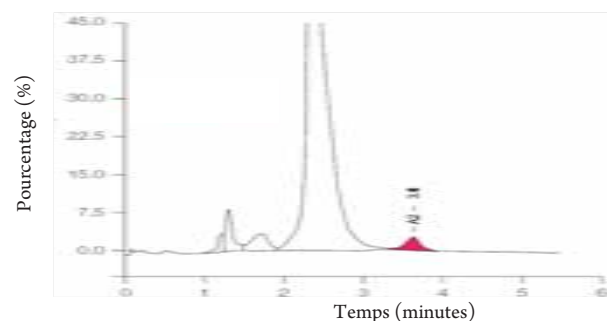
Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Normal	15	Italie	5,33	16,5	30,9	36,9	44,7	84



**HbA<sub>2</sub> = 2,4 %**  
**HbF = 0,4 %**

### Exemple 2 : $\alpha$ -thalassémie mineure

Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Hétérozygotie $\alpha^0$ --MED/ $\alpha\alpha$	18	Italie	6,12	12,9	21,1	30,8	42	68



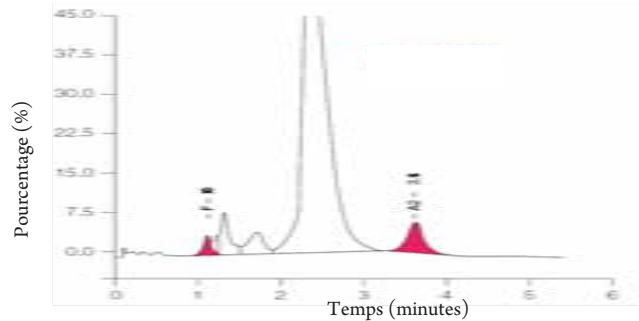
**HbA<sub>2</sub> = 2,6 %**  
**HbF = 0,3 %**

Ferritine

41 ng/ml

### Exemple 3 : $\beta$ -thalassémie mineure

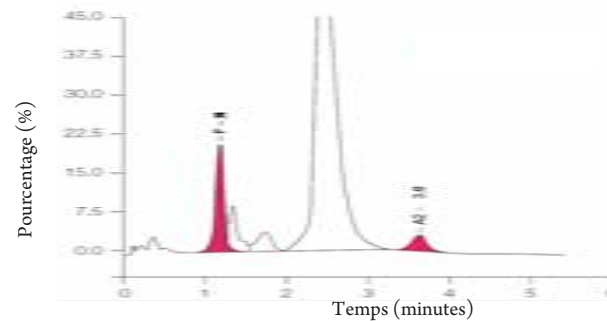
Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Hétérozygotie ( $\beta^\circ$ ) cod 39	36	Italie	5,49	11,8	21,5	31,7	3,37	68



**HbA<sub>2</sub> = 5,8 %**  
**HbF = 1,8 %**

### Exemple 5 : $\delta\beta$ -thalassémie mineure

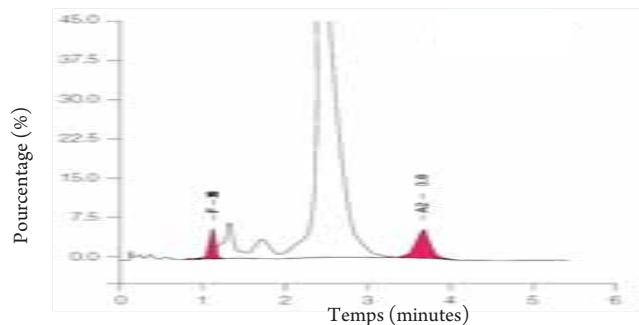
Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Hétérozygotie ( $\delta\beta$ ) Sicile (13,4 Kb délétion)	34	Italie	6,32	12,9	20,4	33,2	38,9	62



**HbA<sub>2</sub> = 3,1 %**  
**HbF = 10,4 %**

### Exemple 4 : $\alpha$ - et $\beta$ -thalassémies mineures associées

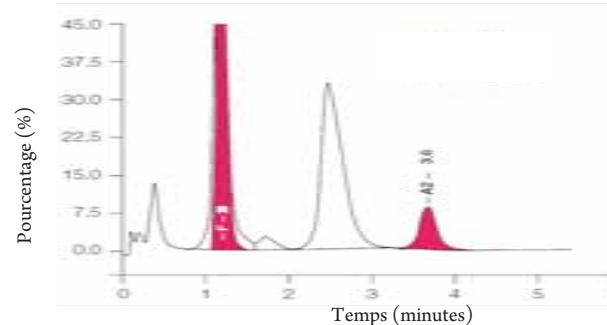
Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Double hétérozygotie ( $\beta^\circ$ ) cod 39 + ( $\alpha^\circ$ ) -- MED	10	Italie	5,28	12,4	23,4	32,4	38,2	72



**HbA<sub>2</sub> = 5,3 %**  
**HbF = 2,5 %**

### Exemple 6 : $\beta$ -thalassémie intermédiaire

Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Homozygotie ( $\beta^+$ )-87 G $\gamma$ -158 C->T	54	Italie	4,79	10,3	21,5	32,0	32,1	67



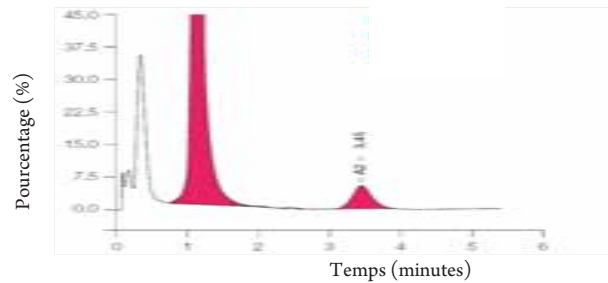
**HbA<sub>2</sub> = 8,3 %**  
**HbF = 55,3 %**  
**HbA = 42,6 %**

Ferritine

1137 ng/ml

### Exemple 7 : $\beta$ -thalassémie majeure

Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Hétérozygotie ( $\beta^\circ$ ) cod S1/ Hb Lepore ( $\delta$ - $\beta$ hybride) G $\gamma$ -158 C->T	8	Roumanie	3,18	6,9	21,7	30,8	22,4	70

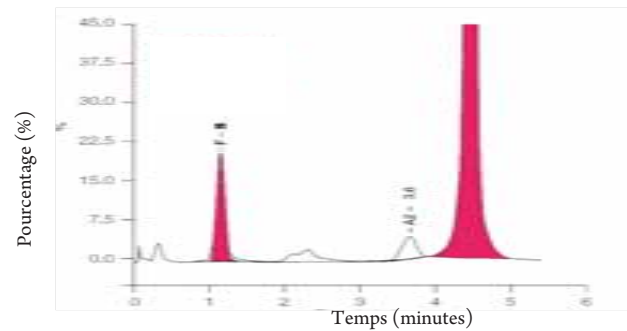


**HbA<sub>2</sub> = 5,4 %**  
**HbF = 94,3 %**  
**HbA = 0 %**

Ferritine  
 235 ng/ml

### Exemple 9 : Drépanocytose homozygote

Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Homozygotie HbS [ $\beta^6$ (A3) Glu->Val]	11	Niger	3,91	7,9	23,3	30,6	26,0	66

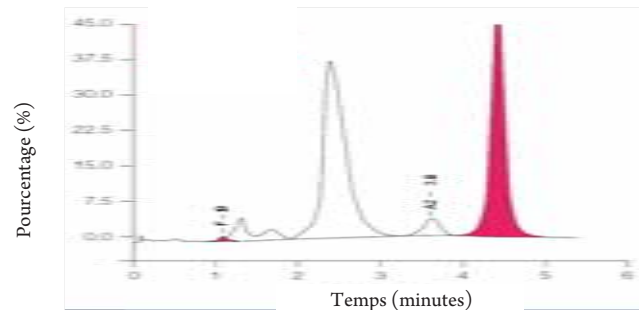


**HbA<sub>2</sub> = 2,4 %**  
**HbF = 0,4 %**  
**HbA = 0 %**  
**HbS = 83,7 %**

Ferritine  
 428 ng/ml

### Exemple 8 : Drépanocytose hétérozygote

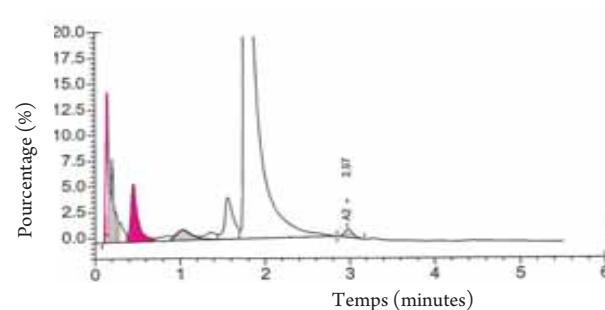
Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Hétérozygotie HbS [ $\beta^6$ (A3) Glu->Val]	34	Nicaragua	4,42	13,1	29,7	33,1	39,6	89



**HbA<sub>2</sub> = 3,7 %**  
**HbF = 0,5 %**  
**HbA = 50,2 %**  
**HbS = 40,2 %**

### Exemple 10 : Hémoglobinosé H

Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
[ $\alpha$ -SEA / $\alpha$ -4.2]	24	Cambodge	6,46	11,7	18,1	31,2	37,5	58

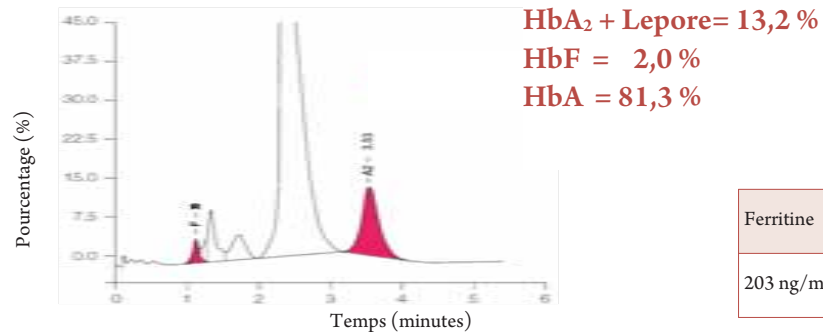


**HbA<sub>2</sub> = 0,8 %**  
**HbF = 0,3 %**  
**HbH = 9,6 %**  
**HbA = 85,1 %**

Ferritine  
 853 ng/ml

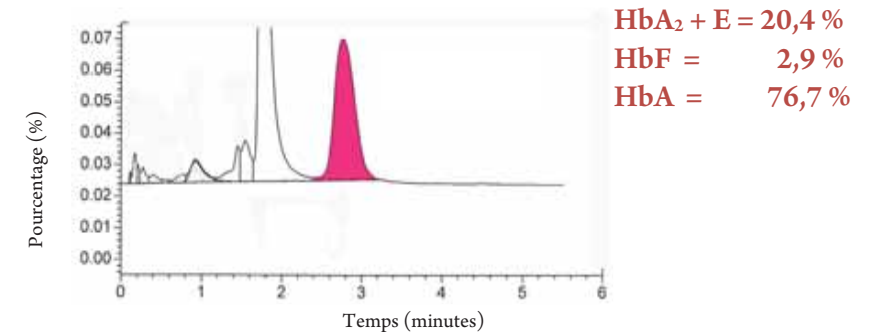
### Exemple 11 : Hb Lepore hétérozygote

Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Hétérozygotie Hb Lepore (δ-β hybride)	18	Italie	6,12	12,9	21,1	30,8	42	68



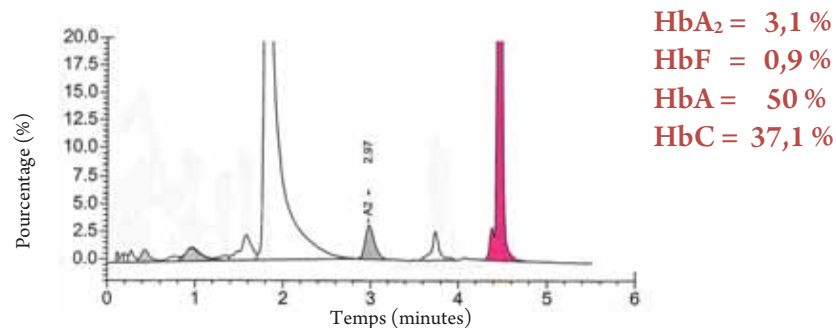
### Exemple 13 : Hémoglobinoses E hétérozygote + α-thalassémie

Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Double hétérozygotie [β26 Glu → Lys] + (α°) -- SEA	34	Vietnam	6,89	14,7	21,4	31,9	46,2	67



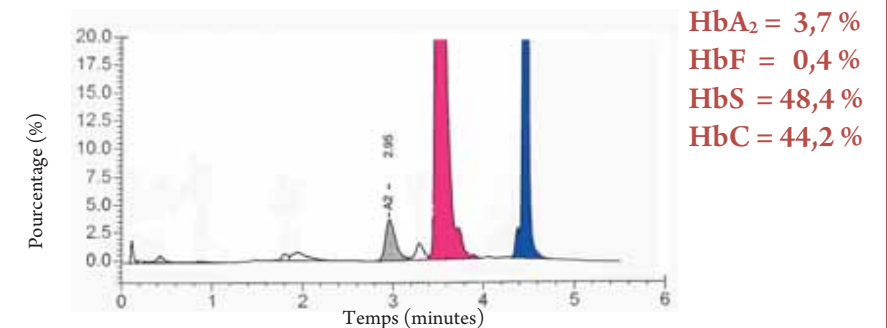
### Exemple 12 : Hémoglobinoses C hétérozygote

Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
[β6 Glu → Lys]	35	Togo	4,87	14	28,7	36	39	80



### Exemple 14 : Hétérozygotie composite SC

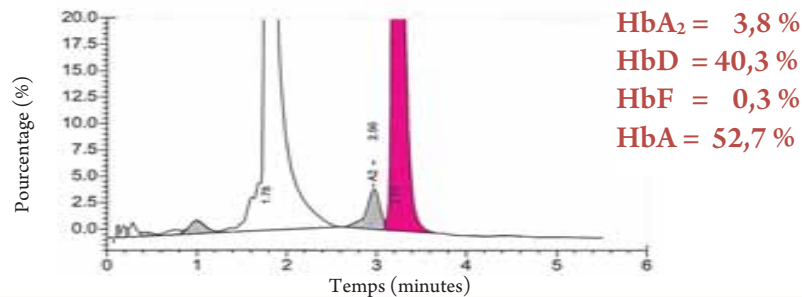
Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
[β6 Glu → Val / β6 Glu → Lys]	14	Jamaïque	4,03	10,5	26	32	33	82





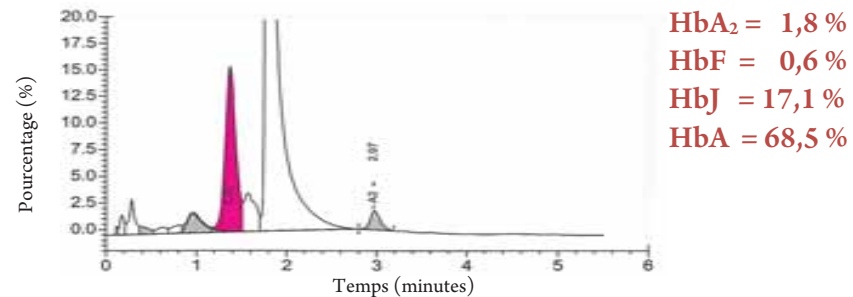
### Exemple 15 : Hb D-Los Angeles (D Punjab)

Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Hétérozygotie HbD-Los Angeles [ $\beta$ 121 Glu->Gln]	73	France	4,09	13,9	34,1	34,3	40,6	99



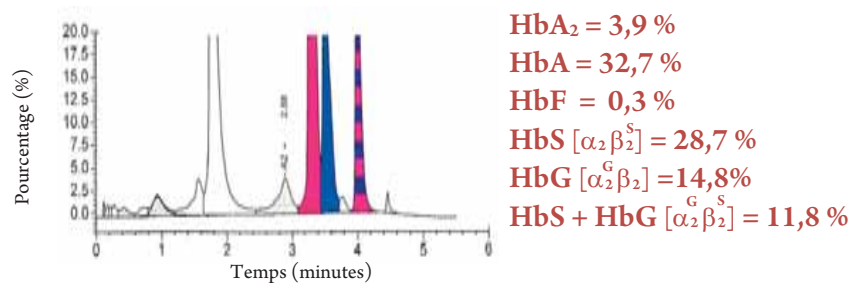
### Exemple 17 : Variant alpha : Hb J-Broussais

Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Hétérozygotie HbJ-Broussais [ $\alpha$ 190 Lys->Asn]	79	France	4,41	13,1	29,8	32,5	40	92



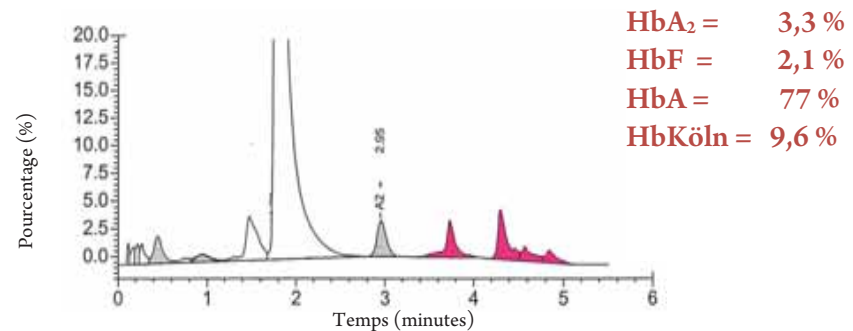
### Exemple 16 : Variant bêta + variant alpha + $\alpha$ -thalassémie

Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Hétérozygotie HbS + hétérozygotie HbG Philadelphie + $\alpha$ -thalassémie [ $-\alpha^G/-\alpha$ ]	71	Antilles	5,73	12,8	22	31	39	68



### Exemple 18 : Variant bêta instable : Hb Köln

Génotype	Age	Origine	Hématies (T/l)	Hb (g/dl)	TCMH (pg)	CCMH (%)	Hématocrite (%)	VGM (fl)
Hétérozygotie Hb Köln [ $\beta$ 98 Val->Met]	10	France	3,95	10,7	27,2	29,2	36,7	93



CERBA  
95066 Cergy-Pontoise cedex 9

☎ : +33 1.34.40.97.76

📠 : +33 1.34.40.21.29

✉ : [intfr@lab-cerba.com](mailto:intfr@lab-cerba.com)

[www.lab-cerba.com](http://www.lab-cerba.com)

N1\_cahierCERBA\_FRA

LES CAHIERS  
CERBA

*Recommandations pour la mise en œuvre  
et l'interprétation de l'étude de l'hémoglobine*

■ ■ ■ *par Isabelle Vinatier,  
Biologiste - laboratoire CERBA*

*Publication scientifique semestrielle éditée par le Laboratoire CERBA*

ISSN (en cours)