

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 17 avril 2018
Par Claire FASQUEL**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
Tient lieu de**

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Variants Instables et Hyperaffins de l'hémoglobine : étude rétrospective ;
méthodes diagnostiques et impact clinique**

Membres du jury :

Président :

Pr Thierry Brousseau, PU-PH, Faculté de Pharmacie Lille 2

Assesseur(s) :

Dr Claude Mereau, MCU-PH, Faculté de Médecine Henri Warembourg, Lille 2

Pr Christian Rose, PU-PH, Université Catholique de Lille

Dr Patrice Maboudou, PH, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHRU Lille



**Faculté de Pharmacie
de Lille**



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	EI Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOIT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques

M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

A mon président de jury,

Monsieur le Professeur Thierry Brousseau,

PU-PH

Professeur de Biochimie, Biologie Moléculaire à la Faculté de Pharmacie de Lille, Université
Lille2

Chef de Pôle du Centre de Biologie Pathologie Génétique du CHRU de Lille

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse.

*Vos grandes capacités de pédagogue au cours de mon cursus universitaire ont su me faire
aimer la Biochimie et la Biologie Moléculaire, vous avez su rendre limpides les processus les
plus complexes.*

Veillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Claude Mereau,

MCU-PH

Maître de Conférences en Biologie Cellulaire à la Faculté de Médecine Henri Warembourg de Lille, Université Lille 2

Praticien Hospitalier en Biochimie « Diagnostic des hémoglobinopathies », Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHRU de Lille

Je vous exprime mes plus sincères remerciements pour votre accompagnement dans ce projet, pour votre disponibilité et votre aide. J'ai su apprécier tout au long de mon stage d'interne dans votre service vos capacités de pédagogue, vous avez su me faire apprécier une discipline encore plus ou moins inconnue pour moi.

J'ai été heureuse de travailler avec vous.

A mes juges,

Monsieur le Professeur Christian Rose,

Professeur agrégé en Hématologie Clinique à l'Université Catholique de Lille
Chef de service d'Onco-Hématologie du groupe Hospitalier de l'Institut Catholique, à
l'hôpital Saint-Vincent de Paul à Lille

*Je tiens à vous exprimer ici mes plus sincères remerciements pour votre accompagnement
tout au long de ce projet.*

*J'ai beaucoup apprécié votre implication, votre disponibilité, votre réactivité, votre
pédagogie ainsi que votre humanité.*

J'ai été heureuse de pouvoir travailler avec vous

Monsieur le Docteur Patrice Maboudou,

Praticien Hospitalier en Biochimie « Diagnostic des Hémoglobinopathies »

Praticien Hospitalier en Biochimie Automatisée

Centre de Biologie, Pathologie, Génétique, CHRU de Lille

Patrice, je te remercie pour ton accompagnement dans ce travail, qui je sais, te tient à cœur. Je tiens également à t'adresser mes remerciements pour ta sympathie, ta bonne humeur, ta disponibilité pendant les semestres d'internat que j'ai pu effectuer à tes côtés.

Merci aux personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail, en particulier le Dr Anne Lambilliotte, pédiatre en Onco-Hématologie à l'Hôpital Jeanne de Flandre du CHRU de Lille.

Merci aux techniciennes du secteur de diagnostic des Hémoglobinopathies : Carinne, Marie-Agnès, Odile et Valérie qui m'ont beaucoup appris sur les techniques et qui m'ont fait apprécier mon stage.

Merci à tous mes Co-internes, en particulier ; Antoine, Julien, Marie, Maxime et Lucas, vous avez rendu mon Internat joyeux.

Merci aux biologistes, en particulier ; Audrey, qui est devenue une amie, Céline, une belle rencontre, Salma et Thomas qui m'ont beaucoup aidé dans l'apprentissage de ce métier, j'ai été heureuse de travailler avec vous.

Merci à Bérangère, Capucine, Justine, Louise, Margot, Marine, Orlane et Pauline qui ont rendu plus belles mes années à la Faculté.

A Charles mon fiancé,

Merci de m'avoir apporté ton soutien sans lassitude et ton Amour depuis la première année. Tu as su rendre belles ces années par toutes tes attentions au quotidien, et merci pour Ioup qui m'a beaucoup aidé.

Je suis comblée de vivre à tes côtés, je t'aime.

A mes parents,

Merci pour votre soutien, vos encouragements et votre Amour tout au long de ce parcours qui n'aurait pas été possible sans vous. Vous me rendez si fière, vous avez su me donner toutes les chances pour réussir et vous avez su croire en moi. Merci de m'avoir rendue forte et déterminée. Je vous dédie ce travail.

A ma sœur,

Chloé, ma petite sœur, ma confidente, merci pour ta joie de vivre au quotidien, ton humour, ta bienveillance et tes encouragements. Je me sens plus proche de toi que jamais. Je suis fière de la femme que tu es devenue.

A Capucine,

Je te remercie pour tes encouragements, ton soutien, ta bonne humeur, et pour tous les moments partagés, nous n'oublierons jamais nos années de Fac.

A Catherine,

Je vous remercie pour votre aide précieuse, pour m'avoir aidée à comprendre les notions complexes de la Biologie Cellulaire, pour votre soutien et vos encouragements.

Merci également à Hélène et Jean-Claude.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	13
INTRODUCTION	16
GENERALITES	19
I. LA MOLECULE D'HEMOGLOBINE	20
1. STRUCTURE.....	20
2. FONCTIONS DE LA MOLECULE D'HEMOGLOBINE.....	21
a. <i>Transport d'oxygène</i>	22
b. <i>Régulation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène</i>	23
3. GENETIQUE DE LA MOLECULE D'HEMOGLOBINE.....	25
a. <i>Evolution ontogénique de l'hémoglobine</i>	25
b. <i>Les différentes hémoglobines</i>	26
c. <i>L'organisation des gènes de l'hémoglobine</i>	27
II. LES HEMOGLOBINOPATHIES	29
A - VARIANTS LES PLUS FREQUENTS	31
1. L'HEMOGLOBINE S.....	31
a. <i>Epidémiologie</i>	31
b. <i>Les différents génotypes</i>	32
c. <i>Physiopathologie</i>	32
d. <i>Manifestations cliniques</i>	35
e. <i>Dépistage néonatal de la drépanocytose</i>	37
f. <i>Prise en charge</i>	37
2. L'HEMOGLOBINE E.....	39
a. <i>Epidémiologie</i>	39
b. <i>Physiopathologie</i>	39
c. <i>Manifestations cliniques</i>	39
3. HEMOGLOBINE C.....	40
a. <i>Epidémiologie</i>	40
b. <i>Physiopathologie</i>	40
c. <i>Clinique</i>	40
4. AUTRES VARIANTS ANORMAUX CLINIQUEMENT SIGNIFICATIFS.....	41

5.	LES BETA-THALASSEMIES.....	42
a.	<i>Epidémiologie</i> :.....	42
b.	<i>Physiopathologie</i>	43
c.	<i>Mutations β-thalassémiques</i>	43
d.	<i>Présentation clinique</i>	44
e.	<i>Traitements</i>	46
6.	LES ALPHA-THALASSEMIES :	47
a.	<i>Définition</i>	47
b.	<i>Epidémiologie</i>	47
c.	<i>Physiopathologie</i>	48
d.	<i>Présentation clinique</i>	48
7.	AUTRES SYNDROMES THALASSEMIQUES	50
B - LES VARIANTS RARES D'HEMOGLOBINE		53
1.	LES HEMOGLOBINES INSTABLES	53
a.	<i>Définition et historique</i>	53
b.	<i>Epidémiologie</i>	54
c.	<i>Physiopathologie</i>	55
d.	<i>Clinique et prise en charge</i>	57
2.	LES HEMOGLOBINES HYPERAFFINES.....	58
a.	<i>Définition</i>	58
b.	<i>Physiopathologie</i>	59
c.	<i>Clinique et prise en charge</i>	61
3.	AUTRES VARIANTS RARES.....	61
a.	<i>Les Hémoglobines hypoaffines</i>	61
b.	<i>Les Hémoglobines M</i>	62
METHODE D'ETUDE DE L'HEMOGLOBINE AU LABORATOIRE DU CHRU DE LILLE		63
I. RECHERCHE D'UNE ANOMALIE DE L'HEMOGLOBINE (RAHB)		64
1.	PRE-ANALYTIQUE	64
2.	TECHNIQUES DE PREMIERE INTENTION	64
a.	<i>Electrophorèse capillaire</i>	65
b.	<i>Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)</i>	67
c.	<i>Isoélectrofocalisation (IEF)</i>	68
II. TECHNIQUES COMPLEMENTAIRES DANS LE DIAGNOSTIC DES HEMOGLOBINES HYPERAFFINES ET INSTABLES		70
1.	HEMOGLOBINE HYPERAFFINE	70

a. Mesure de la PO ₂ 50.....	70
2. HEMOGLOBINES INSTABLES.....	71
a. Test d'instabilité à l'isopropanol.....	71
b. Recherche de corps de Heinz.....	73
3. IDENTIFICATION DU VARIANT RARE PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE	74
RECUEIL DE DONNEES DES VARIANTS RARES AU LABORATOIRE.....	77
I. METHODE	78
II. RESULTATS HEMOGLOBINES HYPERAFFINES	79
1. CIRCONSTANCES DE DIAGNOSTIC	79
2. DEMARCHE DIAGNOSTIQUE D'UNE HEMOGLOBINE HYPERAFFINE.....	80
3. VARIANTS MIS EN EVIDENCE AU CHRU DE LILLE	82
4. CONCLUSION VARIANTS D'HEMOGLOBINE HYPERAFFINE	90
III. RESULTATS HEMOGLOBINES INSTABLES.....	95
1. ANEMIE HEMOLYTIQUE	95
2. VARIANTS INSTABLES MIS EN EVIDENCE AU CHRU DE LILLE	96
3. CONCLUSION VARIANTS INSTABLES.....	108
DISCUSSION.....	116
ABREVIATIONS.....	120
ANNEXES.....	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	135

INTRODUCTION

Les maladies de l'hémoglobine sont aujourd'hui un important problème de santé publique. En effet, on estime que 5,2 % de la population présente un variant cliniquement significatif (HbS, HbE, HbC, HbD, β -thalassémie, α 0-thalassémie) ; 20,7 % de la population mondiale présente une α -thalassémie ; 1,1% des couples dans le monde risquent d'avoir des enfants atteints d'un trouble de l'hémoglobine (1).

On recense aujourd'hui 1700 variants décrits dans la base de données internationales en ligne (HbVAR) (2). Parmi ces troubles de l'hémoglobine, l'HbS responsable de la drépanocytose est la plus fréquente et notamment en France. Dans notre pays, la prévalence est d'un enfant atteint sur 1900 naissances, ce chiffre en fait la maladie génétique la plus fréquente du pays. Toutefois, il faut noter que cette prévalence est beaucoup plus importante dans les départements d'Outre-mer et en région parisienne où se concentrent les populations à risque (3). Ces pathologies de l'hémoglobine touchent plus particulièrement les régions du monde impaludées mais les mouvements importants de population des dernières décennies les ont rendues très présentes en Europe de l'Ouest.

Outre ces désordres fréquents, le laboratoire est amené à identifier des variants beaucoup plus rares, difficiles à diagnostiquer. Il s'agit par exemple des hémoglobines instables responsables d'anémie hémolytique dont il existe environ 150 variants décrits ou encore des hémoglobines hyperaffines responsables de polyglobulie dont on compte aujourd'hui une centaine de variants répertoriés. Ces pathologies tendent à faire partie de tout le cheminement diagnostic des anémies hémolytiques ou des polyglobulies.

C'est à ces deux types de variants que nous avons voulu nous intéresser. En particulier, nous avons décidé de faire un recensement de toutes les hémoglobines hyperaffines et instables qui ont pu être diagnostiquées au laboratoire, et d'étudier leur présentation clinico-biologique ainsi que la démarche diagnostique entreprise pour les mettre en évidence. En effet, le problème que présente l'identification de ces variants est que l'on dispose de très peu de données, aucun consensus au niveau du diagnostic ou des traitements n'a été mis en place.

Nous avons donc entrepris une étude rétrospective des variants rares (hémoglobines instables et hyperaffines) qui ont été identifiés dans le secteur des hémoglobinopathies des Dr Claude Mereau et Patrice Maboudou de l'Institut de Biochimie et Biologie moléculaire du Centre de Biologie Pathologie Génétique du CHRU de Lille depuis 1993. Ce laboratoire appartient au centre de Référence pour la prise en charge de la pathologie érythrocytaire de Lille dirigé par le Professeur Christian Rose, hématologue référent et dont fait également partie le Dr Anne

Lambilliotte, hématologue pédiatre. Par la suite, cette étude pourra concerner d'autres centres de compétence et de référence.

Les objectifs du travail étaient les suivants :

- Rappeler dans un premier temps les caractéristiques des hémoglobinopathies en différenciant les troubles fréquents des maladies rares.
- Définir les techniques du laboratoire mises en œuvre afin de mettre en évidence les variants rares.
- Recenser et recueillir les données diagnostiques, biologiques et cliniques des variants que nous avons identifiés au laboratoire.

GENERALITES

I. La molécule d'hémoglobine

1. Structure

C'est depuis les années 1960 que la structure spatiale de l'hémoglobine a été découverte grâce à la diffraction par Rayons X (4).

L'hémoglobine est un hétérotétramère constitué de quatre sous unités de globine identiques deux à deux, c'est une protéine globulaire. Deux monomères alpha longs de 141 acides aminés et deux monomères bêta possédant 146 résidus d'acides aminés. Au sein de chaque globine on trouve une molécule d'hème qui est définie comme étant une ferroporphyrine de type IX (Fig 1). Elle est constituée d'un noyau porphyrine et d'un atome de fer central sous forme réduite (Fe^{2+}) seule forme capable de fixer l'oxygène. La forme oxydée (Fe^{3+}) est impropre au transport de l'oxygène et correspond à la méthémoglobine. L'hème est logé dans une crevasse hydrophobe afin d'éviter l'oxydation de la molécule de fer (5).

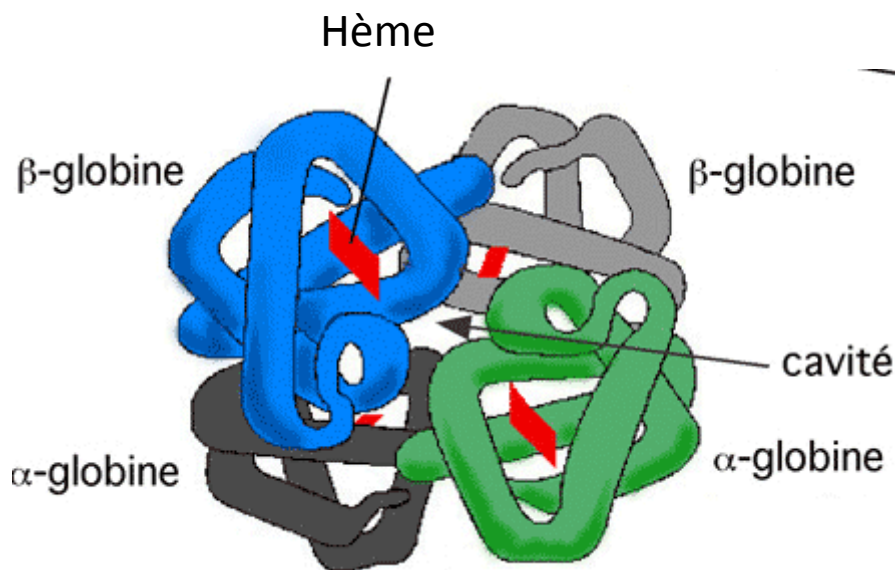


Figure 1 : Tétramère d'hémoglobine et ses différentes zones de contact (6)

L'hémoglobine possède donc une structure primaire définie par la séquence en acides aminés des chaînes de globine, une structure secondaire (alternance d'hélices α et non α), une structure tertiaire définie par l'arrangement tridimensionnel du monomère de globine qui permet de délimiter une poche à hème. En effet, chaque chaîne de globine est repliée en 8 hélices α numérotées de A à H, l'hème se loge entre les hélices E et F (Fig. 2).

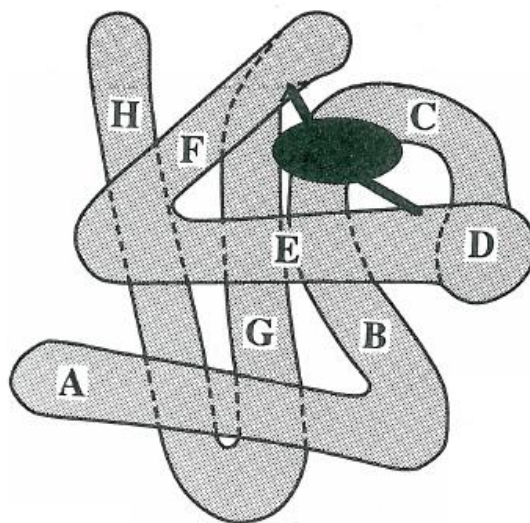


Figure 2 : Structure schématique d'une sous-unité de globine (7)

Enfin, la molécule d'hémoglobine possède une structure quaternaire définie par les interactions entre les monomères au sein du tétramère. Les chaînes α et β sont associées entre elles par des liaisons fortes ($\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$) qui jouent un rôle essentiel dans la stabilité et des liaisons faibles ($\alpha_1\beta_2$ et $\alpha_2\beta_1$) qui jouent un rôle dans le processus de transition allostérique.

La molécule d'hémoglobine existe en réalité sous deux formes en équilibre. Au cours de la fixation ou libération d'oxygène, les sous-unités de l'hémoglobine subissent des mouvements faisant intervenir les liaisons faibles : elles se contractent à l'état oxygéné et se dilatent à l'état désoxygéné. La forme oxygénée est donc plus compacte on la nomme forme T (forme Tendue) qui a une affinité faible pour l' O_2 et la forme désoxygénée est appelée forme R (Relâchée) qui a une plus forte affinité pour l'oxygène.

Dans la forme R, l'atome de fer n'est pas placé exactement dans le plan de l'hème et se trouve donc plus proche de l'histidine proximale, la cavité centrale est plus petite ce qui augmente l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Nous verrons que certains paramètres physiologiques sont capables de stabiliser une forme ou l'autre (8).

2. Fonctions de la molécule d'hémoglobine

L'atome de fer établit 4 liaisons covalentes avec le noyau tétrapyrrolique de l'hème, une 5^{ème} liaison avec l'histidine F8 « histidine proximale » de la globine ce qui permet de lier l'hème à

la globine. Il reste un site de coordination libre qui est le site de fixation de l'O₂, situé juste en face de l'histidine E7 « histidine distale ». Ainsi, chaque molécule d'hémoglobine fixe 4 molécules d'oxygène et constitue l'oxyhémoglobine (Fig. 3).

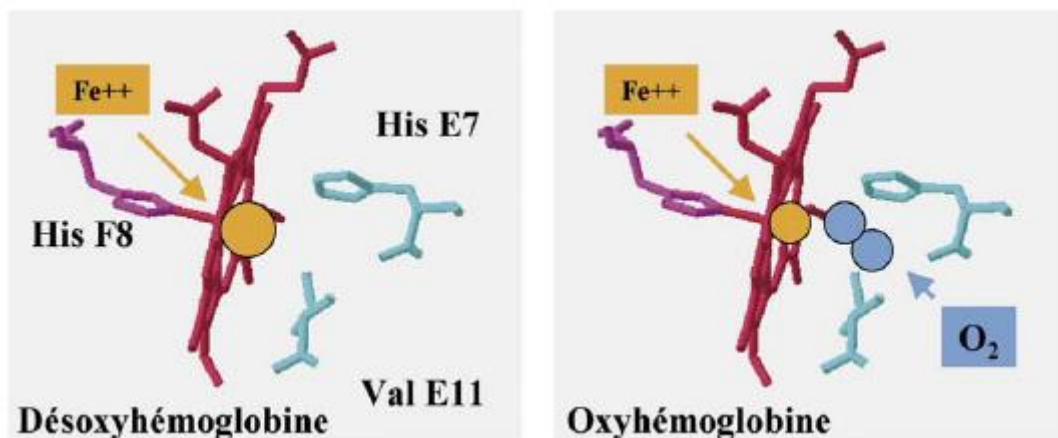


Figure 3 : Structure de l'hème et fixation de l'oxygène (9)

L'hémoglobine a une fonction de transporteur d'oxygène, les globules rouges qui contiennent 33% d'hémoglobine sont à l'origine de ce pouvoir oxyphorique du sang. Le transport de dioxygène se fait des échangeurs respirateurs vers les tissus, l'hémoglobine doit donc pouvoir libérer rapidement son oxygène afin d'établir un gradient de PO₂ suffisant entre le sang artériel et la mitochondrie où cet oxygène sera utilisé pour le métabolisme cellulaire.

L'hémoglobine a également un rôle de transporteur de CO₂ de façon plus accessoire par un mécanisme de carbamylation (les groupements NH₂ terminaux des chaînes de globine vont réagir avec le CO₂).

Enfin d'une certaine manière, l'hémoglobine va jouer un rôle de tampon de pH dans les érythrocytes.

a. Transport d'oxygène

Les courbes de dissociation de l'oxygène ont permis de définir l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et ainsi d'évaluer la capacité de transport du dioxygène par l'hémoglobine. C'est en 1904 que Bohr publia les 1^{ères} courbes de dissociation. Cette courbe d'allure sigmoïde démontre que l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène est d'autant plus faible que la PO₂ est faible, ainsi au niveau des poumons elle fixera aisément des molécules d'O₂ pour les libérer dans les tissus où la PO₂ est faible. L'oxygène se fixe mieux sur une hématie déjà oxygénée et à l'inverse s'en libère plus facilement quand le globule rouge est peu oxygéné.

Ce phénomène témoigne d'un effet de coopérativité dans la fixation de l'oxygène, cette courbe sigmoïde implique qu'au fur et à mesure de l'oxygénation la fixation se fait plus facilement. Cela résulte d'une interaction entre les quatre molécules d'hème, l'oxygénation d'une sous-unité du tétramère entraîne l'augmentation de l'affinité pour l'oxygène des autres sous-unités encore désoxygénées.

La courbe de dissociation de l'oxygène va permettre de définir l'affinité de l'hémoglobine pour l'O₂ en mesurant la pression de demi-saturation ou P₅₀ qui correspond à une saturation de l'hémoglobine de 50 % (Fig. 4) (9).

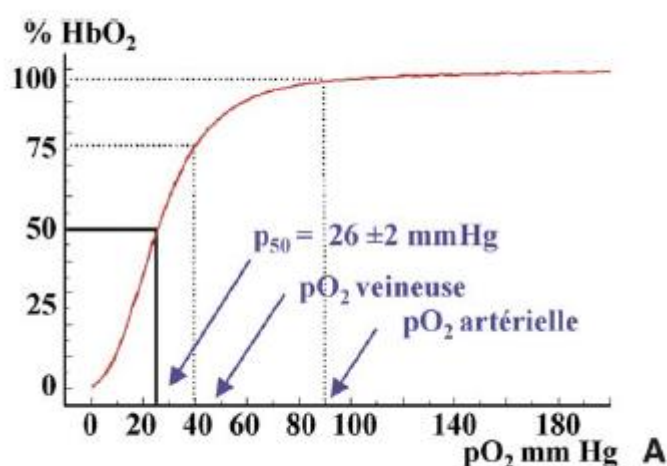


Figure 4 : Courbe de dissociation de l'oxygène (9)

Une P₅₀ normale chez l'homme correspond à une valeur de PO₂ de 26 +/- 2 mmHg. La valeur de ce paramètre va varier en sens inverse de l'affinité, c'est-à-dire qu'une hémoglobine qui aura une affinité augmentée pour l'oxygène aura une P₅₀ diminuée (déplacement de la courbe de dissociation vers la gauche) et inversement pour une diminution de l'affinité.

b. Régulation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène

De nombreux facteurs contribuent physiologiquement à diminuer l'affinité de l'hémoglobine et assurent ainsi l'efficacité de la fonction oxyphorique.

- **Effet bohr**

Le CO₂ diminue l'affinité de l'hémoglobine pour l'O₂ en diminuant le pH. L'acidification du milieu a pour effet d'augmenter l'ionisation des chaînes de globines et d'augmenter le nombre et l'énergie des liaisons salines stabilisant la forme T de faible affinité pour l'O₂.

Le CO₂ libéré des tissus va pénétrer le globule rouge et subir la réaction suivante sous l'action de l'anhydrase carbonique :



Les ions H⁺ sont pris en charge par l'hémoglobine qui joue son rôle de tampon en les fixant, ce qui a pour effet de stabiliser la forme désoxygénée. Une augmentation de la PCO₂ est donc responsable d'une augmentation de la P₅₀ soit une diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour l'O₂ (Fig. 5).

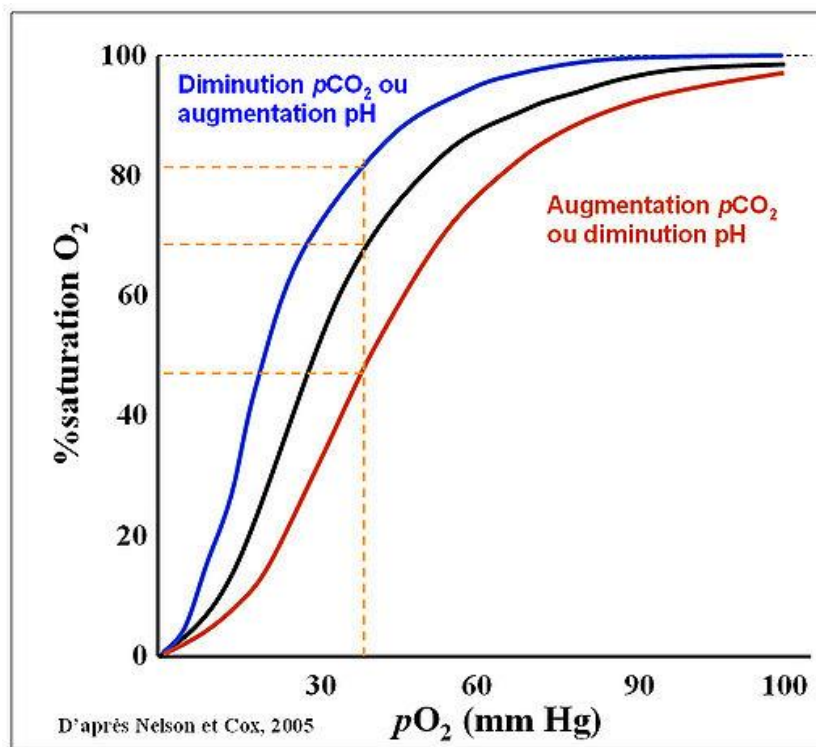


Figure 5 : Effet de la variation de PCO₂ et du pH sur la courbe de dissociation (10)

- **Intéraction avec le 2-3 BPG**

Le 2-3 Bisphosphoglycérate (2-3 BPG) est un phosphate organique, intermédiaire du métabolisme du glucose, présent en concentration élevée dans les érythrocytes. Cette molécule va se loger au cœur du tétramère d'hémoglobine et établir des liaisons ioniques avec

des radicaux des sous-unités β de l'hémoglobine. Son encombrement stérique est tel qu'elle peut uniquement se loger au sein de la forme T de l'hémoglobine et stabiliser cette forme. Le 2-3 BPG a donc pour effet d'augmenter la P_{50} et de diminuer l'affinité de l'hémoglobine pour l' O_2 .

On sait que l'affinité de l'hémoglobine F pour l'oxygène est plus élevée que celle de l'hémoglobine A. En effet, cela permet d'installer un gradient naturel du dioxygène du sang maternel vers le sang fœtal. Cette différence d'affinité entre ces deux hémoglobines est liée au fait que l'hémoglobine fœtale est beaucoup moins sensible au 2-3 BPG que l'hémoglobine adulte (11).

L'augmentation de la température va également avoir pour conséquence un déplacement de la courbe vers la droite, une diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour l' O_2 .

3. Génétique de la molécule d'hémoglobine

a. Evolution ontogénique de l'hémoglobine

Plusieurs formes d'hémoglobines (Hb) se succèdent et se chevauchent au cours de la vie, on appelle cela l'évolution ontogénique (Fig. 6).

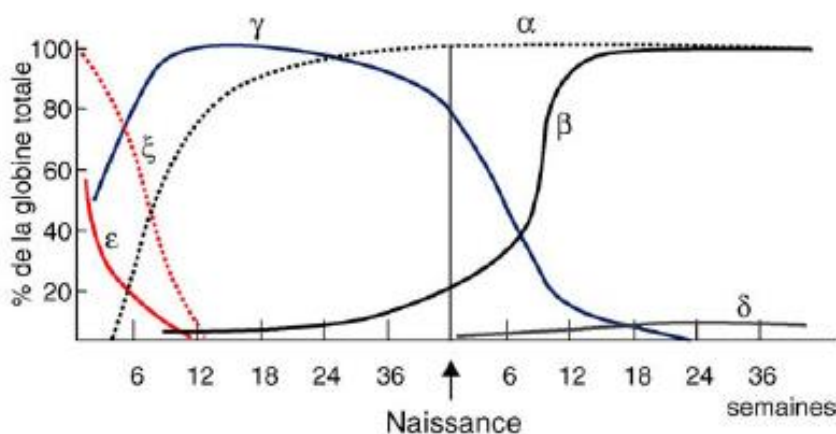


Figure 6 : Evolution des différentes hémoglobines humaines (12)

Ces différentes formes d'hémoglobines diffèrent par la nature des sous-unités qui les composent. L'évolution ontogénique de l'homme comprend 2 « switch » ou commutations ; la première commutation coïncide avec le passage de la vie embryonnaire à la vie fœtale, la seconde a lieu lors du passage de la vie fœtale à la vie adulte. Le profil d'expression des différentes hémoglobines permet de comprendre pourquoi les anomalies des chaînes α s'expriment cliniquement dès la période néonatale, voire anté-natale alors que les anomalies

de la chaîne β s'expriment à partir de 3-4 mois de vie et sont parfois de diagnostic difficile en période néonatale.

b. Les différentes hémoglobines

• Hémoglobines embryonnaires

Il existe 3 hémoglobines embryonnaires : Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) et l'hémoglobine Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Ces formes embryonnaires sont donc constituées de 2 types de sous-unités α : les chaînes ζ et les chaîne α ; ainsi que de 2 types de sous-unités β : les chaînes ε qui sont exclusivement présentes pendant cette période de la vie et les chaînes γ qui composent également l'hémoglobine fœtale.

• Hémoglobines Fœtales

L'Hb fœtale (Hb F) de structure ($\alpha_2\gamma_2$) est exprimée dès les premiers stades de la gestation, (à partir de la 5^{ème} semaine de vie intra-utérine) et va atteindre 90% dès la 10^{ème} semaine et jusqu'à la naissance. La sous-unité fœtale γ est en réalité elle-même constituée de deux espèces moléculaires très proches qui ne diffèrent que par la nature de l'acide aminé en position 136 (Ala et Gly) : $A\gamma$ et $G\gamma$ qui sont exprimées en proportion variable selon la période de vie. Ainsi, le rapport $A\gamma/G\gamma$ voisin de 3/1 pendant la vie fœtale évolue vers une valeur de 2/3 à la naissance.

Peu avant la naissance, entre la 32^{ème} et la 36^{ème} semaine de gestation, la synthèse des chaînes polypeptidiques β de globine adulte débute au dépend des chaînes γ qui diminuent progressivement.

• Hémoglobines adultes

Le profil électrophorétique adulte commence à s'observer vers l'âge de 6 mois de vie, mais on attend l'âge d'un an pour établir le profil définitif (règles du laboratoire). L'hémoglobine A ($\alpha_2\beta_2$) est le constituant majeur et représente plus de 95% de la totalité des hémoglobines. Cette dernière est en fait formée de l'hémoglobine A0 (le constituant majeur) et de l'hémoglobine A1 (sa forme glyquée).

Il existe une autre forme mineure : l'hémoglobine A2 ($\alpha_2\delta_2$) dont la synthèse débute pendant la période néonatale.

L'hémoglobine F subsiste également à l'état de traces durant la vie adulte, son expression est normalement inférieure à 1% et restreinte aux cellules dites « cellules F » (13). Un taux d'Hb F inférieur à 3% peut persister jusqu'à l'âge de 5 ans en absence de toute hémoglobinopathie.

Période	Types d'hémoglobines exprimées	Chaînes de globine	Proportion des différentes hémoglobines
Embryonnaire	Gower 1	$\zeta_2 \epsilon_2$	
	Gower 2	$\alpha_2 \epsilon_2$	
	Portland	$\zeta_2 \gamma_2$	
Foetale	Hémoglobine F	$\alpha_2 \gamma_2$	80-95 %
	Hémoglobine A	$\alpha_2 \beta_2$	5-20 %
Adulte	Hémoglobine A	$\alpha_2 \beta_2$	95-97%
	Hémoglobine A ₂	$\alpha_2 \delta_2$	2,2-3,2%
	Hémoglobine F	$\alpha_2 \gamma_2$	<1%

Tableau 1 : Les différentes hémoglobines humaines

Parallèlement à cette évolution ontogénique, il y a un changement d'organes où va s'effectuer l'érythropoïèse : elle a lieu dans le sac vitellin durant la vie embryonnaire puis au niveau du foie et de la rate pendant la vie foetale pour enfin avoir lieu dans la moelle osseuse dès le second trimestre et pendant tout le reste de la vie.

c. L'organisation des gènes de l'hémoglobine

Toutes les Hémoglobines sont des tétramères constituées de 2 sous-unités de la famille α globine dont les gènes sont situés sur le bras court du chromosome 16 et de 2 sous-unités de la famille des β globines dont les gènes sont situés sur le bras court du chromosome 11, les

gènes sont disposés de 5' en 3' dans l'ordre dans lequel ils seront exprimés au cours du développement (Fig.7).

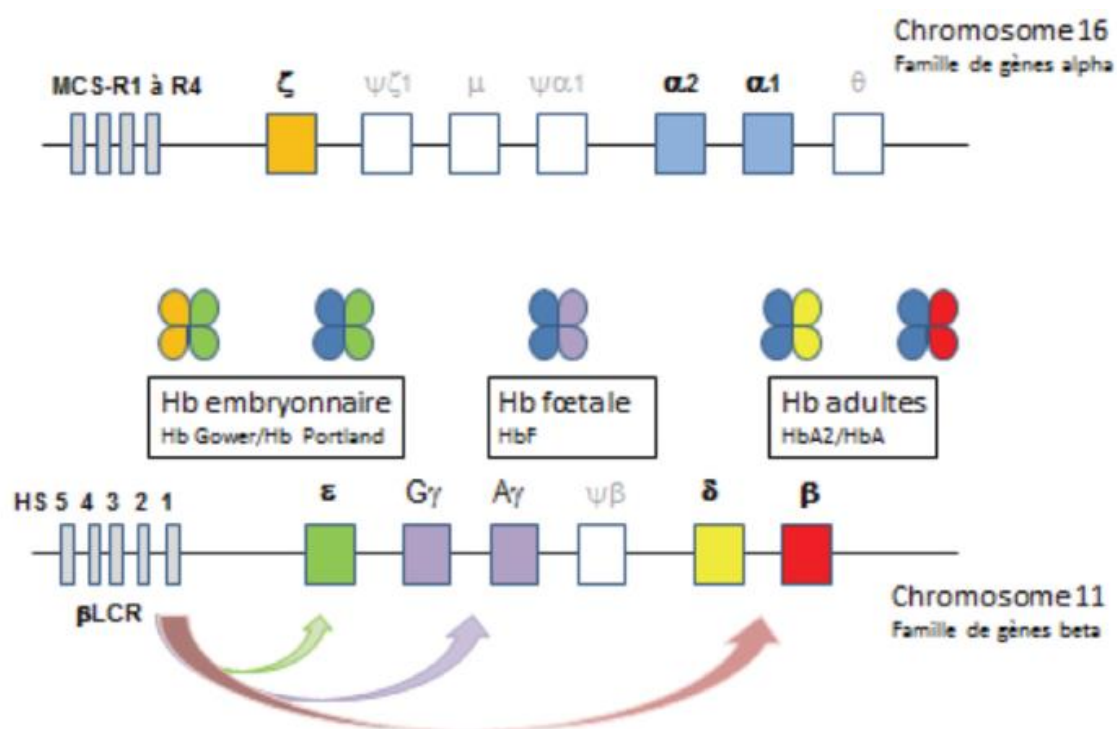


Figure 7 : Organisation des gènes des locus α et β (14)

- Les gènes du locus α

Ce locus comprend trois gènes. La chaîne α est codée par les gènes α_1 et α_2 qui ont une séquence codante identique. La chaîne ζ homologue de la chaîne α chez l'embryon est codée par un gène ζ . Sur ce locus on trouve aussi des gènes non fonctionnels qui ne codent pour aucune chaîne polypeptidique appelés pseudo-gènes : $\psi\zeta$, $\psi\alpha_2$ et $\psi\alpha_1$.

- Les gènes du locus β

Le locus β contient cinq gènes disposés de la manière suivante de 5' à 3' : ϵ codant la chaîne embryonnaire, $A\gamma$ et $G\gamma$ codant la chaîne γ de l'hémoglobine F, le gène δ codant la chaîne δ de l'hémoglobine A2 et enfin le gène β codant la chaîne β de l'hémoglobine A.

Tous les gènes sont constitués de 3 exons et de 2 introns, la différence résulte dans le fait que le 2^{ème} intron est beaucoup plus long que le 1^{er} dans la famille β alors qu'ils sont du même ordre de grandeur dans la famille α .

L'hémoglobine A est donc codée par les gènes α présents en quatre exemplaires (chaque gène est responsable de la synthèse d'environ 25% des chaînes α) et par les gènes β présents en

deux exemplaires (chaque gène étant responsable de la synthèse d'environ 50% des chaînes) (14).

La régulation des gènes de globine implique une spécificité tissulaire, une spécificité de stade de développement (embryon, fœtus, adulte) et il existe une coordination pour aboutir à une synthèse équivalente des gènes de la famille α et des gènes de la famille β .

Il existe des séquences régulatrices qui modulent le niveau d'expression du gène en l'activant (enhancers) ou en inhibant l'expression (silencers). Des séquences de spécificité tissulaire du génome des gènes de type β situées en 5' du gène ϵ sur le locus β permettent d'exprimer de manière efficace l'ensemble des gènes β en respectant les étapes de l'ontogénèse, on les appelle HS (*Séquence Hypersensible*) ou LCR (*locus Control Region*). Il en existe aussi sur le locus α en 5' du gène ζ MCS-R (*Multispecies conserved Sequence*). La régulation équilibrée des 2 locus est attestée par la pathologie thalassémique induite en cas de déséquilibre. Il existe une protéine chaperone codée par le gène AHSP (Alpha Hemoglobin Stabilizing Factor) de spécificité érythroïde qui assure la stœchiométrie finale en se liant aux chaînes α néosynthétisées et en les accompagnant jusqu'à leur association aux chaînes β pour former un tétramère d'hémoglobine (15).

II. Les hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies correspondent à des affections constitutionnelles de l'hémoglobine. Elles sont responsables dans certains cas d'anémie hémolytique, elles rentrent dans la classification des anémies hémolytiques dites corpusculaires. Plus de 1700 variants d'hémoglobines sont aujourd'hui répertoriés dans une banque de données en ligne (HbVar) mais seuls 1/3 d'entre eux ont des répercussions cliniques (2). Elles présentent une répartition géographique particulière. En effet, les formes graves d'hémoglobinopathies sont réparties essentiellement dans les régions du monde impaludées, ceci s'explique par le fait que les formes hétérozygotes de certaines hémoglobinopathies sont protectrices vis-à-vis du parasite, il y a donc une pression de sélection qui confère un avantage de survie à ces patients. Les nombreuses migrations de population des dernières décennies font que ces pathologies sont devenues très fréquentes dans les pays exemptés de paludisme comme en Europe de l'Ouest (Fig.8)(16).

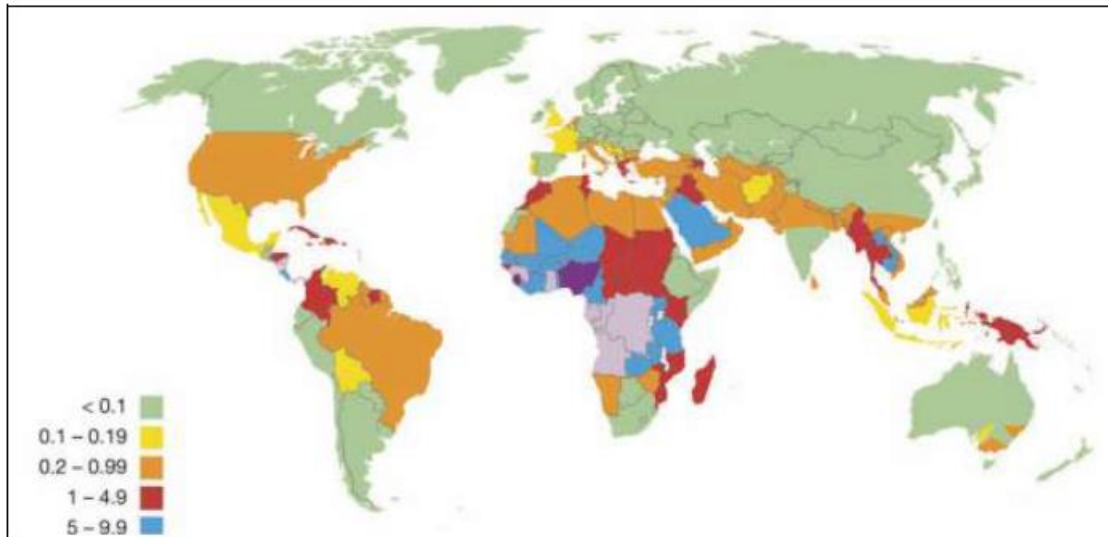


Figure 8 : Répartition géographique des naissances présentant une forme grave d'hémoglobinopathie (Source : Organisation Mondiale de la Santé 2008)

Les hémoglobinopathies sont classiquement distinguées en deux catégories, différentes dans leur expression et leur physiopathologie :

- Les hémoglobinopathies avec anomalie de synthèse, défaut quantitatif de production de l'hémoglobine normale qui constituent le groupe hétérogène des thalassémies.
- Les hémoglobinopathies avec anomalie de structure, défaut qualitatif avec production en quantité normale d'une hémoglobine « anormale ». On peut distinguer 4 groupes parmi les hémoglobines anormales :
 - Les variants qui sont à l'origine de problèmes de santé publique majeurs : Il s'agit surtout de l'hémoglobine S dans la population africaine et de l'hémoglobine E dans la population asiatique d'autant plus grave si elle est associée à une β^0 -thalassémie.
 - Les autres variants présents dans les populations où l'Hb S a une forte prévalence ; c'est le cas de l'hémoglobine C, O-Arab, D-Punjab qui sont responsables de syndromes drépanocytaires majeurs associés à l'HbS.
 - Les polymorphismes, totalement silencieux sur le plan clinique, découverts lors d'un dosage d'hémoglobine glyquée par exemple, doivent être caractérisés et rapportés dans les banques de données pour éviter qu'ils ne soient confondus avec des variants aux conséquences cliniques graves.

- Les variants rares à l'origine de désordre hématologique variés : Il s'agit notamment des hémoglobines instables responsables d'anémie hémolytique chronique et des hémoglobines hyperaffines responsables de polyglobulie, ce sont ces types de variants qui intéressent particulièrement notre propos. On pourra également citer les hémoglobines hypo-affines et les hémoglobines M (cause de méthémoglobinémie) (17).

Il est intéressant de souligner l'importance de l'emplacement de la mutation dans la structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine qui est étroitement liée à la dysfonction qu'elle engendre. Une mutation de surface est en général sans conséquence pathologique (A l'exception de l'hémoglobine S). En revanche, une mutation située plus en profondeur ou dans les zones de contacts des différentes molécules de globine va entraîner des problèmes de stabilité ou dans la fonction oxyphorique de la molécule (12).

Nous allons maintenant pouvoir décrire les variants d'hémoglobine que l'on a jugé les plus pertinents en commençant par les plus fréquents (hémoglobines anormales les plus fréquentes et famille des thalassémies) pour finir par les plus rares en particulier les hémoglobines instables et hyperaffines qui nous intéressent particulièrement dans cette étude.

A - Variants les plus fréquents

➤ Avec anomalie de structure de la protéine

1. L'hémoglobine S

La drépanocytose est la première maladie moléculaire décrite, il s'agit d'une affection monomutationnelle de transmission autosomique récessive. L'Hb S est connue depuis 1949 grâce à la découverte de Pauling (prix Nobel de chimie en 1954) (18). La mutation n'a été découverte que quelques années plus tard : mutation du 6^{ème} codon du gène β GAG>GTG entraînant le remplacement de l'acide glutamique 6 par une valine sur la séquence d'acide aminé (19).

a. Epidémiologie

L'hémoglobine S (de « Sickle » = faucille) est le variant d'hémoglobine le plus fréquent. Sa répartition géographique initiale est l'Afrique (plus particulièrement l'Afrique subsaharienne), l'Inde et la péninsule arabique. Cela correspond à des régions du monde

impaludées, il y a donc eu un processus de polymorphisme équilibré ayant entraîné une survie préférentielle des sujets drépanocytaires hétérozygotes, il s'agit là d'un des meilleurs exemples de la « sélection naturelle ».

Les flux migratoires et les mouvements de population l'ont rendue très présente en Amérique du Nord, aux Antilles, au Brésil et en Europe de l'Ouest. La prévalence en France est d'un enfant pour 1900 naissances ce qui en fait la maladie génétique la plus fréquente dans ce pays (20). Cette prévalence est beaucoup plus élevée dans les départements d'Outre-mer et en région parisienne où se concentrent les populations à risque.

b. Les différents génotypes

On parle de drépanocytose chez les sujets homozygotes HbS/HbS, suite au brassage important des populations, il existe des formes dites « hétérozygotes composites ». Les génotypes suivants sont considérés comme syndrome drépanocytaire majeur (SDM) et entraînent une symptomatologie importante :

- L'HbS associée à un défaut bêta-thalassémique chez les patients présentant la mutation β^s sur un allèle et une mutation bêta-thalassémique sur l'allèle controlatéral, définissant une hétérozygotie composite β^s/β^0 ou β^s/β^+ .
- L'HbS associée à des variants spécifiques de l'hémoglobine chez des patients qui présentent une hétérozygotie composite : β^s/β^c pour la plus fréquente, β^s/β^{O-Arab} , $\beta^s/\beta^{D-Punjad}$, et plus rarement ; β^s/β^E et β^s/β^{Lepore} ou encore Hb^S/Hb^C Harlem, Hb^S/Hb^C Antilles (21).

Quel que soit le type de SDM, le taux d'HbF peut-être augmenté (>1% chez l'enfant de plus de un an). Ce taux est soumis à différents facteurs modulateurs notamment des facteurs génétiques présents sur le cluster bêta définissant les haplotypes. Pour les plus connus, on sait que le taux d'HbF est de 5-7% pour l'haplotype Bantu, Benin et Cameroun, 7-10% pour l'haplotype Sénégal, 10-25% pour l'haplotype Arabo-Indien (22).

c. Physiopathologie

Le mécanisme de base qui explique la survenue des événements vaso-occlusifs de la maladie est la polymérisation de l'hémoglobine S désoxygénée. En effet, au cours de la désoxygénation dans la micro-circulation l'HbS subit un changement conformationnel. Le remplacement de l'acide glutamique, acide aminé hydrophile, par la valine, acide aminé

hydrophobe est à l'origine de la formation de liaisons hydrophobes entre la valine et d'autres résidus hydrophobes des chaînes β d'autres molécules d'HbS.

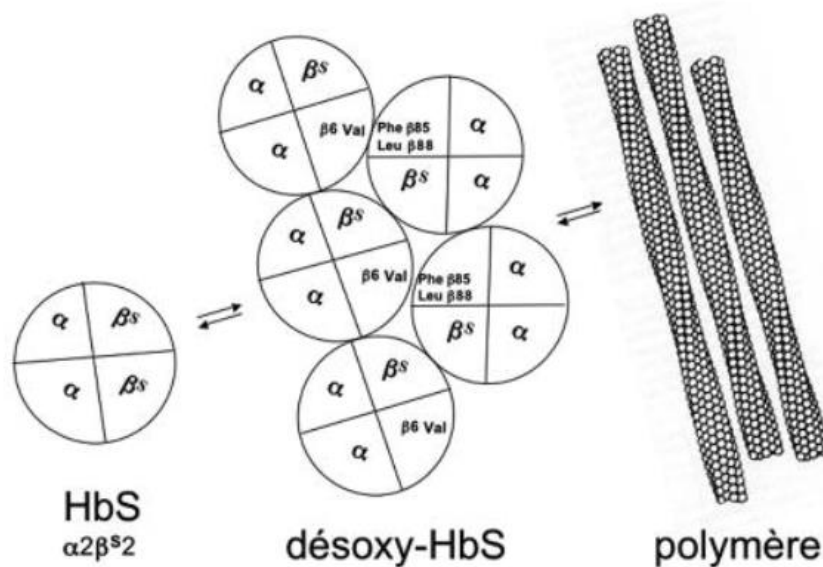


Figure 9 : Mécanisme de formation des polymères d'hémoglobine S (23)

On assiste donc à la formation d'un polymère d'hémoglobine S qui s'allonge en fibres hélicoïdales rigides se regroupant et provoquant la falciformation des hématies (Fig.9). Cette déformation des globules rouges est caractéristique de la maladie (Fig.10). Tout ce processus prend un certain temps qui est inversement proportionnel à la concentration intra-érythrocytaire en hémoglobine (21).

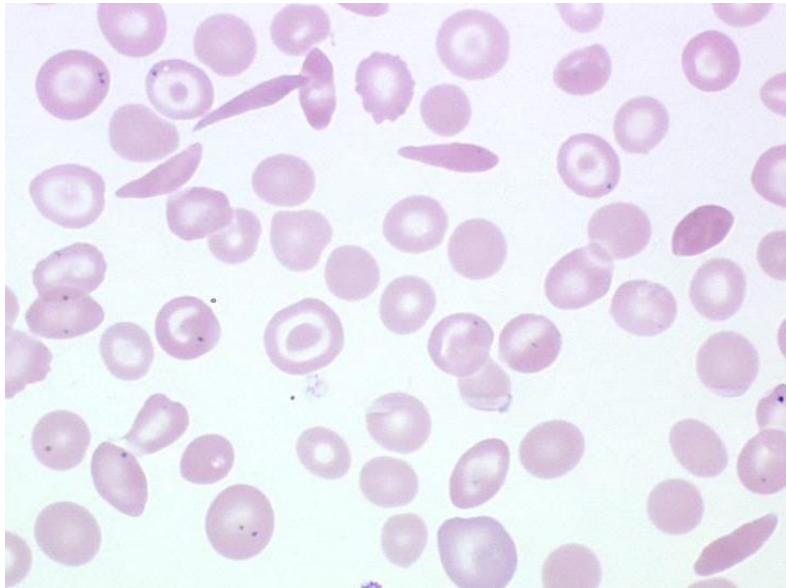


Figure 10 : frottis sanguin avec drépanocytes (Photo du laboratoire d'hématologie du CHRU de Lille)

En même temps que la falciformation et la polymérisation, s'opère une dérégulation de l'homéostasie des cations avec une activation des canaux ioniques entraînant une déshydratation de l'érythrocyte ce qui a pour conséquence d'augmenter la concentration en hémoglobine et donc de favoriser la polymérisation.

Tout ce mécanisme explique la physiopathologie de la classique crise vaso-occlusive douloureuse (CVO) et rend compte de la fragilisation des globules rouges à l'origine de l'anémie hémolytique, mais ce schéma n'explique pas le déclenchement de ces CVO.

Des données plus récentes indiquent que les globules rouges drépanocytaires ont une adhérence accrue à l'endothélium vasculaire, il s'agit en fait d'une population d'érythrocytes « jeunes » appelés aussi réticulocytes de « stress » qui expriment des protéines d'adhérence à l'endothélium, cela va permettre de ralentir le flux circulatoire et de conduire inévitablement à l'occlusion complète des micro-vaisseaux (23).

L'initiation et la propagation de la vaso-occlusion passent par le fait que l'environnement vasculaire du patient drépanocytaire est pro-inflammatoire, en témoignent l'activation exacerbée des cellules endothéliales et des polynucléaires neutrophiles. L'adhésion des polynucléaires activés à l'endothélium va permettre le recrutement des hématies faucilles du drépanocytaire. La vaso-occlusion de la drépanocytose se produit après une cascade

d'interaction entre les hématies falciformes, les polynucléaires neutrophiles et les cellules endothéliales (Fig.11) (24).

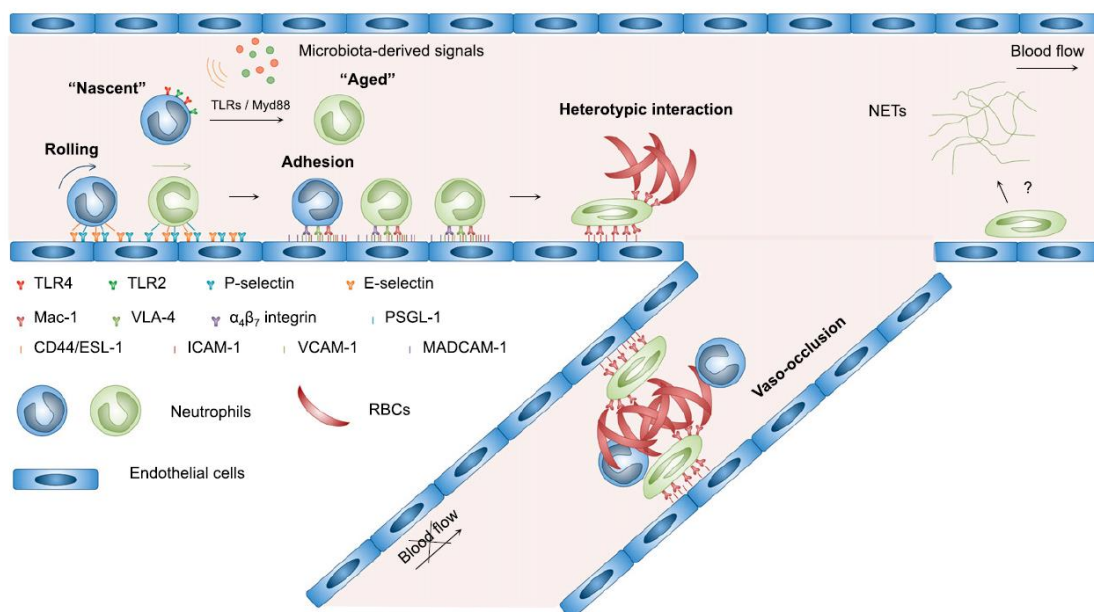


Figure 11 : Modèle multi-étapes et multi-cellulaires de la vaso-occlusion par les hématies falciformes (24)

Il a également été montré que chez ces patients, le monoxyde d'azote (NO) vasodilatateur est en concentration diminuée par rapport à l'endothéline 1 (ET-1) aux propriétés vasoconstrictives. Il en résulte un état vasoconstrictif susceptible de participer au ralentissement du flux circulatoire (23).

d. Manifestations cliniques

➤ Patient Hétérozygote HbA/HbS

La plupart des sujets porteurs d'un trait drépanocytaire sont asymptomatiques. Il peut exister des atteintes rénales avec hématuries macro et microscopiques et des manifestations vaso-occlusives sont possibles (notamment un infarctus splénique) en cas de situation hypoxémique profonde (7).

➤ Patient homozygote Hb^S/Hb^S et drépanocytaire majeur :

Les premiers signes cliniques n'apparaissent qu'à partir de l'âge de six mois avec le remplacement de l'HbF par l'HbS. Le tableau clinique comporte trois phases : les phases dites stationnaires (état basal), les complications aiguës, les complications chroniques.

- Phase stationnaire
 - Signes cliniques liés à l'anémie hémolytique chronique (paleur, dyspnée d'effort, asthénie, subictère conjonctival).
 - Retard à la puberté et à la maturation osseuse.
 - Splénomégalie, constante chez le nourrisson mais disparaît le plus souvent spontanément.
- Complications aiguës
 - Crises douloureuses drépanocytaires ou crises vaso-occlusives : dominent la symptomatologie pendant la petite enfance puis s'espacent au cours de l'adolescence. Associent des douleurs à de la fièvre, elles sont spontanées ou provoquées (infections, froid, fatigue, toute situation entraînant une hypoxie). Les crises intéressent souvent les membres, régions vertébrales et dorso-lombaires. Syndrome mains-pieds chez l'enfant de moins de cinq ans (tuméfaction bilatérale des pieds et des mains).
 - Syndrome thoracique aiguë (STA) : 2^{ème} cause d'hospitalisation du patient drépanocytaire (la 1^{ère} étant les douleurs aiguës). Triade qui associe douleur thoracique/fièvre/foyer pulmonaire à l'auscultation. Il concerne surtout les patients adultes.
 - Infections : Les infections bactériennes sont responsables de la principale cause de morbi-mortalité dans les premières années de vie, les pneumopathies représentent l'accident infectieux le plus fréquent.
 - Accidents vaso-occlusifs graves : Accidents neurologiques, thrombose de l'artère centrale de la rétine, priapisme ...
- Complications chroniques : Rarement observées pendant l'enfance, concerne surtout l'adolescence et les adultes.
 - Ulcères de jambes, nécroses osseuses, complications rénales, oculaires, pulmonaires, cardiaques, hépato-biliaires...(25)

e. Dépistage néonatal de la drépanocytose

En 1995, l'Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE) a organisé et mis en place un programme de dépistage néonatal de la drépanocytose en France métropolitaine. Ce dépistage est généralisé à tous les nouveaux-nés dans les départements d'Outre-mer : Guadeloupe et Martinique depuis 1985, la Réunion en 1990, Mayotte et la Guyane en 1992, et s'est étendu progressivement en France métropolitaine pour atteindre toutes les régions en 2000. Il rejoint les dépistages de la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie congénitale, l'hyperplasie congénitale des surrénales, la mucoviscidose dont bénéficient tous les nouveaux nés à trois jours de vie par prélèvement capillaire au talon. Mais, le dépistage néonatal de la drépanocytose est un dépistage « ciblé ». En effet, il a pour particularité de n'être réalisé que chez les nouveaux nés dont les parents sont originaires d'Afrique Subsaharienne, des Antilles, et du Maghreb. Les prélèvements sont envoyés à des laboratoires spécialisés (3 laboratoires en France métropolitaine dont un à Lille). L'hémoglobine est éluee à partir d'un disque de 3 mm de diamètre du papier Guthrie, puis les techniques utilisées sont :

- Electrophorèse capillaire (capillarys Sebia) + CLHP (variant NBS BioRad) (techniques de Lille)

L'incidence moyenne de la drépanocytose en métropole était de 1/743 nouveaux nés testés, un enfant atteint pour 1900 naissances (26).

f. Prise en charge

- Prévention

La prise en charge du patient drépanocytaire passe dans un premier temps par l'éducation thérapeutique, le patient doit connaître les facteurs favorisant les CVO : l'hypoxie (effort excessif et inhabituel, séjour à plus de 1500m d'altitude, vêtements trop serrés...), le refroidissement et les variations de température importantes (bains chauds ou froids...), la fièvre, la déshydratation, le stress, la prise d'excitants : alcool, tabac, drogues illicites (notamment chez les adolescents).

Le patient doit savoir reconnaître les signes suivants qui imposent une consultation en urgence : une douleur qui ne cède pas au traitement antalgique initial, une fièvre supérieure à 38,5 °C, des vomissements, des signes d'anémie aiguë, c'est-à-dire l'apparition brutale (pâleur importante, asthénie intense, altération de l'état général).

La prévention des infections est essentielle dans la prise en charge notamment chez l'enfant drépanocytaire. Une antibioprophylaxie antipneumococcique par pénicilline V est recommandée à partir de l'âge de 2 mois jusqu'à l'âge d'au moins 5 ans. La vaccination anti-pneumococcique est également recommandée (vaccin hexavalent chez les enfants de moins de deux ans puis vaccin polysaccharidique 23 valent chez les plus de 2 ans et rappel tous les 3 à 5 ans).

La prévention de la survenue d'un accident vasculaire cérébral passe par la réalisation d'un doppler transcranien à partir de l'âge de 12 à 18 mois.

Enfin, la prévention de la survenue de CVO passe aussi par une hydratation orale régulière et adaptée aux besoins (27).

➤ Traitements

- Traitements symptomatiques des CVO utilisation d'analgiques, par paliers (paracétamol, AINS, dérivés morphiniques) et traitement précoce des infections (28).
- Mise en place d'un programme transfusionnel (transfusions, échanges transfusionnels) qui permet de traiter les symptômes de la maladie, mais aussi de prévenir des complications, notamment la vasculopathie cérébrale chez les enfants. L'allo-immunisation post-transfusionnelle est plus fréquente chez les patients drépanocytaires en France (origine ethnique souvent différente entre le donneur et le patient). A noter que le trait drépanocytaire n'est pas une contre-indication au don du sang (26).
- L'autre problème du programme transfusionnel est représenté par la surcharge martiale post-transfusionnelle que connaissent ces patients, prise en charge par des traitements chélateurs de fer.
- Traitement par hydroxycarbamide (SIKLOS[®]) : Diminue la fréquence et la sévérité des crises douloureuses et améliore la qualité de vie, augmente l'espérance de vie, au prix d'une surveillance hématologique régulière. Son mécanisme passe par l'induction de la synthèse d'Hb F, la réduction de l'adhésion excessive des érythrocytes à l'endothélium, la leucopénie relative induite par le traitement (diminution des polynucléaires activés) (29).
- Allogreffe de moelle osseuse ; seul traitement curatif (réservée au drépanocytoses sévères, STA ou CVO sous Hydroxyurée ...)

- Emergence de nouveaux traitements : thérapie ciblée : crizanlizumab (Anticorps humanisé anti-P selectin), inhibiteur d'AKT (30).

2. L'hémoglobine E

a. Epidémiologie

Il s'agit d'un variant d'hémoglobine très répandu en Asie du Sud-Est (Cambodge, Laos, sud de la Chine...) Les cas français ne sont pas rares en raison notamment de la migration des populations d'anciennes colonies françaises (comme le Cambodge ou le Laos).

b. Physiopathologie

Ce variant est causé par une mutation ponctuelle sur le codon 26 du gène de la β globine entraînant le remplacement d'un acide glutamique par une lysine créant un mutant de surface, cette substitution n'affecte pas la fonction de l'hémoglobine. D'autre part, cette mutation crée un site cryptique d'épissage partiellement utilisé qui dévie une partie de l'ARNm vers une maturation anormale aux dépens de la production d'ARNm normal, cette diminution d'ARNm normal conduit à un défaut de production et constitue donc un défaut bêta-thalassémique.

c. Manifestations cliniques

- Sujet hétérozygote Hb^A/Hb^E : patients asymptomatiques, du fait de la propriété β thalassémique, les hématies sont microcytaires, hypochromes avec quelques cellules cibles sur le frottis.
- Homozygotie Hb^E/Hb^E : plus ou moins asymptomatiques (correspond à une thalassémie mineure) microcytose, hypochromie, nombreuses cellules cibles au frottis, réticulocytes normaux.
- Hétérozygotie composite Hb^E/Hb^{β^0} : sévérité clinique variable allant de la forme bêta-thalassémique intermédiaire à une bêta-thalassémie majeure transfusion dépendante.
- Hétérozygotie composite Hb^E/Hb^S qui constitue une Syndrome drépanocytaire majeur qui apparait cliniquement comme une hétérozygotie composite β^S/β^+ (31)(32).

Dans la plupart des cas, aucun traitement n'est nécessaire, en cas de E- β thalassémie les patients sont répondeurs aux agents augmentant l'hémoglobine F comme l'Hydrea, le recours aux transfusions est parfois nécessaire. Certains patients hétérozygote composite présente des formes de β thalassémie majeure qui sont transfusions dépendantes, on peut avoir recours pour ces patients à de la thérapie génique (essais cliniques) (33).

3. Hémoglobine C

a. Epidémiologie

L'hémoglobine C est une des trois hémoglobines anormales les plus fréquentes chez l'homme (avec l'Hb^S et l'Hb^E). Elle est fréquente en Afrique de l'Ouest : Ghana, Côte d'Ivoire, Burkina Fasso, Togo, Benin... Ce variant d'hémoglobine est également largement représenté chez les populations noires vivant aux Etats-Unis et aux Caraïbes. Comme pour l'hémoglobine S on la retrouve dans des régions du monde impaludées car elle est associée à un risque diminué de développer des formes cliniques graves de paludisme (réduction du risque de 29% chez les hétérozygotes et de 93% chez les homozygotes) (34).

b. Physiopathologie

La mutation affecte le 6^{ème} codon de la chaîne de β globine comme pour l'hémoglobine S, mais cette fois l'acide glutamique est remplacé par une lysine. A la différence de l'HbS, l'HbC n'est pas à l'origine de la formation de polymères. Cette anomalie provoque la formation de cristaux intra-érythrocytaires qui sont responsables d'une augmentation de la densité du globule rouge et de sa déshydratation et une altération des échanges ioniques transmembranaires. Les hématies sont donc microcytaires et hyperchromes, on observe sur le frottis des cellules cibles, des microsphérocytes et des inclusions cristallines (35).

c. Clinique

L'intérêt clinique principal de la mise en évidence d'un variant d'hémoglobine C est lié au diagnostic de Syndrome Drépanocytaire Majeur (SDM) que constitue l'association hétérozygote composite Hb^C/Hb^S.

- L'Hétérozygotie Hb^A/Hb^C est asymptotique, observation au frottis sanguin d'une microcytose, hyperchrome.

- L'Homozygotie HbC/HbC : L'hémoglobinosose C s'accompagne d'une discrète anémie hémolytique régénérative en général bien compensée et d'une splénomégalie. Il existe un risque de lithiase biliaire et de carence en folates qui nécessitent un suivi médical.
- L'hétérozygotie composite Hb^S/Hb^C constitue un SDM décrit comme moins sévère cliniquement que les homozygotes β^S/β^S ou β^S/β^0 . L'hémolyse est moins sévère et les crises vaso-occlusives sont rares voire absentes. Cependant, on observe chez ces patients des complications qui sont les mêmes voire plus fréquentes et plus sévères que chez les drépanocytaires telles que des rétinopathies, ostéonécrose de la hanche, atteinte auditive, syndrome thoracique aiguë (35).

Chez ces patients, il peut y avoir une augmentation de la viscosité sanguine pouvant entraîner des complications notamment chez la femme enceinte avec des risques d'AVC, de toxémie gravidique (36).

4. Autres variants anormaux cliniquement significatifs

Nous citerons ici les hémoglobines D-Punjab (*HBB : glu121gln*), qui se rencontre avec une fréquence élevée dans la population du Punjab et de nombreux cas sporadiques ont été décrits dans toutes les populations caucasiennes, et O-Arab (*HBB : glu121lys*), fréquente dans les régions balkaniques. Ces hémoglobinopathies sont asymptomatiques à l'état hétérozygote ou homozygote. Leur importance clinique tient au fait que l'hétérozygotie composite Hb^S/Hb^{O-arab}, Hb^S/Hb^{D-Punjab} constitue des SDM, ces hémoglobines favorisent la polymérisation de l'HbS (37).

➤ Avec anomalies de synthèse des chaînes de globine : les thalassémies

Les thalassémies sont les maladies autosomiques récessives les plus fréquentes dans le monde. Elles sont définies par un déficit de synthèse total ou partiel d'une des chaînes de globine normale. L'hémoglobine A comportant deux chaînes d'alpha globines et deux chaînes de bêta globines, on distinguera selon la nature de la chaîne déficitaire les α ou β thalassémies. Les δ thalassémies et les γ thalassémies seront cliniquement peu significatives étant donné les faibles taux d'hémoglobine A2 ($\alpha_2\delta_2$) et d'hémoglobine F ($\alpha_2\gamma_2$).

Le rapport chaîne de globine de type α / chaîne de globine de type β est physiologiquement régulé et est égal à 1, les deux types de chaînes doivent être synthétisés en quantités

stœchiométriques car les chaînes de globine libres sont instables et précipitent dans les érythroblastes (surtout les chaînes α) (38).

5. Les Bêta-thalassémies

Les β -thalassémies sont définies par un déficit total ou partiel des chaînes de β globine de l'hémoglobine.

a. Epidémiologie :

Les allèles β -thalassémiques sont fréquents dans le bassin Méditerranéen, en Afrique de l'Ouest, au Moyen-Orient, dans le sous-continent Indien, en Asie centrale et en Asie du Sud Est. Les prévalences les plus importantes sont observées à Chypre et en Sardaigne (14% de la population est porteuse hétérozygote) (Fig.12). En raison des migrations de populations, la β -thalassémie est aussi présente en Europe du Nord, en Amérique du Nord et aux Caraïbes (39). Les thalassémies sont devenues depuis quelques années un problème de santé publique en France, on estime à plus de 500 le nombre de β -thalassémiques majeurs ou intermédiaires, la majorité étant recensés dans les grands bassins urbains (Paris, Marseille, Lyon) (40).

De façon assez caractéristique, chaque région du monde présente un type de mutations qui lui est propre.

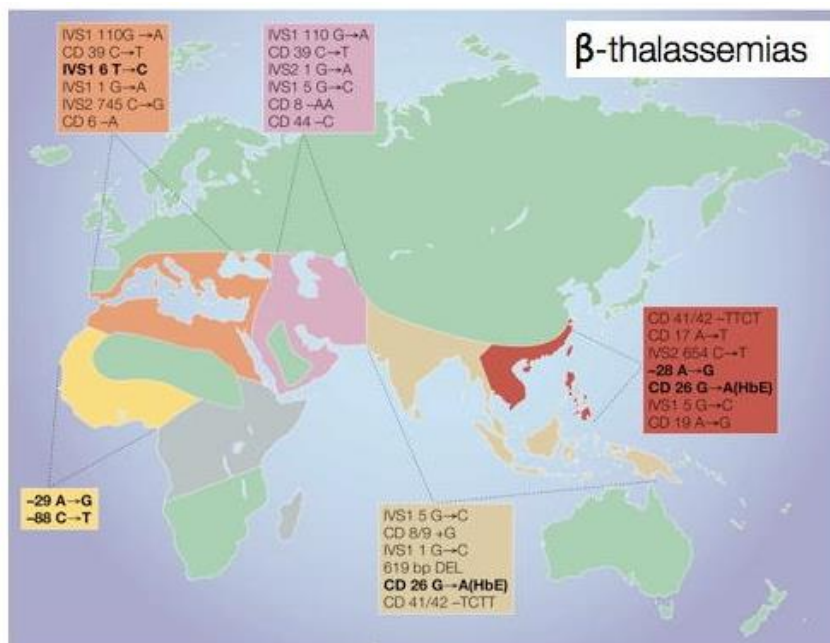


Figure 12 : Carte de répartition des β -thalassémies dans le monde (41)

b. Physiopathologie

Le déficit quantitatif des chaînes de globine de type β par rapport aux chaînes α est à l'origine de deux conséquences cliniques distinctes :

- Une anémie par diminution de la quantité globale d'hémoglobine produite au sein des globules rouges.
- Une hémolyse extra-vasculaire au sein des organes hématopoïétiques en raison de l'excès de chaînes α qui forme des tétramères α_4 instables. Ces tétramères s'oxydent et précipitent dans le cytoplasme des érythroblastes, induisant ainsi leur apoptose excessive. A cela s'ajoutent des altérations membranaires des érythroblastes, à l'origine de la libération de lipides à activité procoagulante et prothrombotique responsables de la rigidité des hématies, qui sont par conséquent éliminées.

c. Mutations β -thalassémiques

Les anomalies β -thalassémiques sont représentées à plus de 90% par des mutations ponctuelles ou des délétions, insertion courtes (<3 bases) (12).

Ces mutations sur le gène HBB du chromosome 11 sont à l'origine de 3 types d'allèles β -thalassémiques : (42)

- Allèle β^0 thalassémique : Aucune synthèse résiduelle de la chaîne de β globine n'est observée. Les mutations à l'origine de ce génotype touchent essentiellement le codon d'initiation de la transcription ou les sites d'épissage.
- Allèle β^+ thalassémique : Dans ce cas, la synthèse des chaînes de β globine est diminuée mais elles ne sont pas totalement absentes. Parfois, la diminution est tellement faible que l'on parle de β^{++} thalassémie. Ici, on observera des mutations surtout au niveau de la région promotrice du gène et parfois au niveau de sites introniques ce qui crée des sites d'épissage alternatif.
- Allèle β -thalassémique dominant (β^{dom}) Les chaînes de β globine sont synthétisées mais elles sont tronquées ou allongées et vont former des tétramères avec les chaînes α ce qui crée une grande instabilité. Ce génotype est rare mais associé à une clinique sévère donc important à diagnostiquer. Des mutations faux-sens au niveau du 3^{ème} exon du gène HBB en sont à l'origine.

d. Présentation clinique

Le terme β -thalassémie englobe 3 formes cliniques différentes : la β -thalassémie majeure (TM) également appelée maladie de Cooley, la β -thalassémie intermédiaire (TI) et la β -thalassémie mineure résumées dans le **tableau 2**.

- β -thalassémie majeure

Il s'agit de l'expression clinique d'un génotype β^0/β^0 (parfois des génotypes β^0/β^+ peuvent être à l'origine d'un TM).

Le diagnostic se fait dans l'enfance en général entre 6 et 24 mois devant une hépatosplénomégalie et un ictère. Il s'agit d'une forme transfusion dépendante, un programme transfusionnel est mis en place dès l'enfance qui va être à l'origine d'une surcharge en fer post-transfusionnelle dont les complications cardiaques constituent la cause de décès la plus fréquente. On notera également des complications hépatiques, des glandes endocrines Cependant, la diversification des traitements chélateurs et les outils d'évaluation radiologiques de la surcharge (IRM hépatique, cardiaque) permettent d'améliorer la prise en charge. L'ostéoporose est également une complication fréquente ainsi que les complications liées à l'hypersplénisme.

Le diagnostic est relativement aisé devant une anémie microcytaire sévère ($< 7\text{g/dL}$), absence d'hémoglobine A, l'hémoglobine F devenant majoritaire ($> 90\%$). Le mécanisme principal de l'anémie étant la dysérythropoïèse par destruction des érythroblastes médullaires et hémolyse périphérique secondaire.

- β -thalassémie intermédiaire (TI)

Les génotypes β^+/β^+ , β^+/β^{++} et β^+/β^0 sont à l'origine de cette forme clinique.

Ce sont des formes intermédiaires entre thalassémie majeure et mineure qui sont d'expression clinique hétérogène.

Certaines TI sont bien tolérées et ne nécessitent pas de transfusion (thalassémie Non Transfusion Dépendante TNTD), alors que chez certains patients, la mise en place d'un programme transfusionnel est nécessaire (mais plus tard que dans la TM).

L'aspect hémolytique est prépondérant dans l'expression clinique avec une splénomégalie marquée, à l'origine de complications thrombotiques notamment veineuses.

Différentes complications apparaissent à l'âge adulte : hémato-poïèse extra-médullaire, ostéoporose, hypertension artérielle pulmonaire, hypogonadisme.

Au niveau biologie, on notera une anémie microcytaire (entre 7-10g/dL d'Hb), une augmentation de l'HbF, une diminution de l'HbA.

- *β-thalassémie mineure*

La β-thalassémie mineure ou trait β-thalassémique est liée à un génotype hétérozygote β⁰/β ou β⁺/β.

Cliniquement asymptomatique mais dont le diagnostic est essentiel pour évaluer le risque de transmission à la descendance. Ces patients présentent une hypochromie et microcytose marquée accompagnée d'une pseudo-polyglobulie, le taux d'hémoglobine est normal ou très peu diminué. On note le plus souvent une augmentation de l'HbA₂ conséquence d'augmentation de la proportion des chaînes δ-globine par rapport aux chaînes β (39).

	Hétérozygote	Hétérozygote composite	Homozygote	
Génotype	β ⁰ /β ou β ⁺ /β	β ⁺ /β ⁰	β ⁺ /β ⁺	β ⁰ /β ⁰
Clinique	β-thalassémie mineure	β-thalassémie intermédiaire	β-thalassémie intermédiaire	β-thalassémie majeure
Sévérité	0	++	++	+++
Splénomégalie	0 à +	+ à +++	+ à +++	+++
Microcytose	++	+ à +++	+ à +++	+++
Taux d'hémoglobine	>10 g/dL	7 à 10 g/dL	7 à 10 g/dL	<7 g/dL
Réticulocytes	Taux normal	++	++	+

Tableau 2 : Tableau résumé de la clinique des thalassémies

e. Traitements

Les grands axes de traitements des patients β -thalassémiques comprennent :

❖ Les transfusions de concentrés de globules rouges :

Comme nous l'avons énoncé précédemment, dans les formes majeures l'objectif est de corriger l'anémie et de freiner l'érythropoïèse inefficace en commençant un programme transfusionnel dès l'enfance.

Dans les formes intermédiaires, la prise en charge dépendra de la sévérité de la maladie, l'objectif principal sera d'améliorer l'anémie ou les signes de dysérythropoïèse s'ils sont symptomatiques, on peut avoir recours à des transfusions ponctuelles voire à un programme transfusionnel initié plus tardivement.

❖ Traitement chélateur du fer : trois molécules disponibles en France : la déféroxamine (Desferal®), la déféripone (Ferriprox®), le déférasirox (Exjade®). Traitement primordial pour éviter les complications de la surcharge martiale dans les formes majeures et intermédiaires.

❖ La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétique : reste actuellement la seule thérapeutique curative de la maladie.

❖ La splénectomie : Rarement indiquée dans la TM puisque le programme transfusionnel permet de réduire la splénomégalie. Dans la TI, peut réduire le degré de l'anémie mais les risques infectieux et thrombotiques limitent son recours.

❖ Hydroxycarbamide (SIKLOS®) et autres traitements inducteurs de l'HbF : indiqués pour l'anémie sévère et dans les tumeurs hématopoïétiques extra-médullaires (43).

❖ Le Sotatercept® : Médicament récent, fonctionne comme un piège « à ligands » pour le récepteur de l'activine, entraîne une réduction significative de l'érythropoïèse inefficace avec amélioration de l'anémie et diminution de la splénomégalie (44).

❖ Thérapie génique : 1er essai clinique chez un patient de génotype β^+/β^0 (33).

6. Les Alpha-thalassémies :

a. Définition

Les α -thalassémies correspondent à un défaut de synthèse des chaînes α de globine de l'hémoglobine. Les α -thalassémies sont dues dans la majorité des cas à des délétions, on peut distinguer deux types de délétions : les délétions de type 1 qui entraînent la perte des deux gènes HBA1 et HBA2 sur le même chromosome, les délétions de type 2 qui entraînent une perte de la partie intergénique entre HBA1 et HBA2.

b. Epidémiologie

Les α -thalassémies sont très répandues dans les régions tropicales et subtropicales du monde. On les retrouve majoritairement en Asie du Sud-Est (Laos, Thaïlande, Cambodge, Vietnam) ainsi qu'en Chine et en Inde. Elles sont également répandues en Afrique équatoriale et sur le pourtour méditerranéen. Comme pour les β -thalassémies, cette hémoglobinopathie a été sélectionnée naturellement dans les régions du monde où sévit le paludisme pour son action protectrice contre les formes graves comme le neuropaludisme (Fig.13).

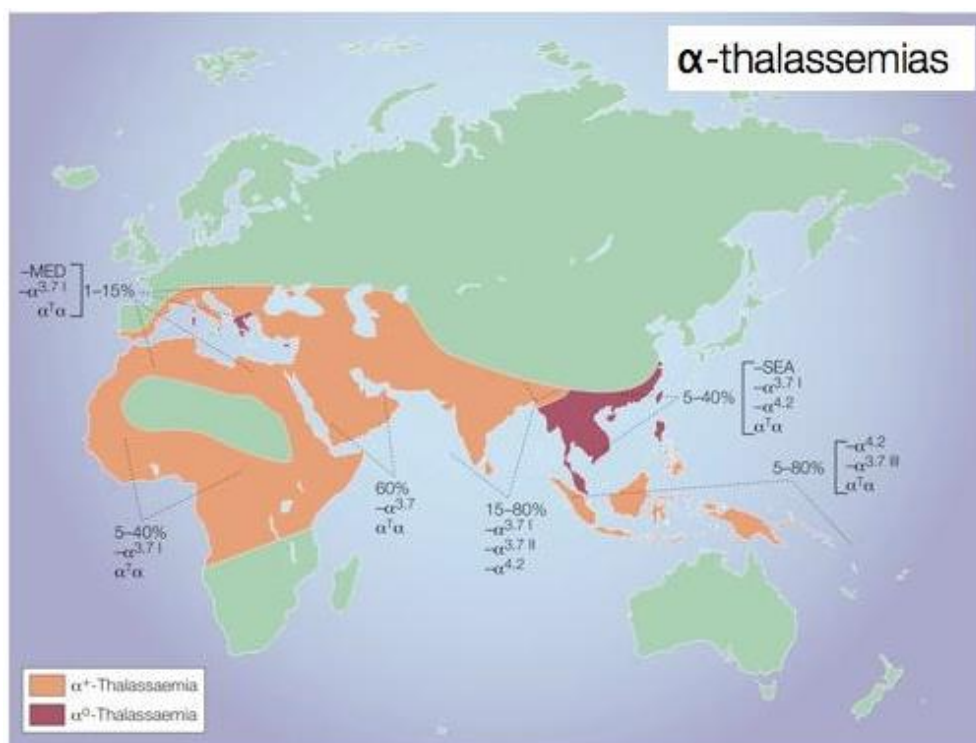


Figure 13 : Carte de répartition des α -thalassémies dans le monde (41)

c. Physiopathologie

Un individu normal possède quatre copies de gènes α , sur chaque chromosome 16 il existe deux gènes α : α_1 et α_2 . D'autre part, nous savons que les gènes α sont normalement exprimés dès la vie fœtale. L'inactivation du gène α va conduire à la formation de tétramères γ_4 (Hb Bart's) visibles uniquement en anté et néo-natal lorsque l'expression des gènes γ est prédominante. Par la suite, il y aura formation de tétramères β_4 (Hb H) lorsque l'expression des gènes β devient majoritaire. Ces tétramères sont instables et inaptes à la fonction oxyphorique et responsables, non pas d'une érythropoïèse inefficace comme dans les β -thalassémies mais plutôt ici d'une destruction périphérique des cellules matures.

On parle d'une α^+ -thalassémie lorsqu'un seul gène α par allèle est exprimé et lorsque les deux gènes sont non exprimés, on parle d'une α^0 -thalassémie (45).

d. Présentation clinique

Il existe une corrélation entre le génotype et le phénotype. Les α -thalassémies s'expriment sous différentes formes cliniques en fonction du nombre de gènes défectueux ou absents. Le **tableau 3** résume les différentes caractéristiques clinico-biologiques que l'on peut observer dans les α -thalassémies. Nous détaillerons par la suite chaque phénotype.

Génotype	Phénotype	Hb Bart's (γ_4)	Données hématologiques
<u>α^+ hétérozygote</u> $-\alpha/\alpha\alpha$	- α -thalassémie de type 2 - Porteur silencieux	1 à 4% à la naissance	Discrète microcytose (VGM = 75-85 fl)
<u>α^0 hétérozygote</u> $--/\alpha\alpha$ <u>α^+ homozygote</u> $-\alpha/-\alpha$	- α -thalassémie de type 1 - Trait α -thalassémique	Environ 10 % à la naissance	Discrète anémie (Hb=11-13g/dL) microcytaire (VGM=65-75fl)
$\alpha^-/--$	- Hémoglobinoses H - α -thalassémie majeure ou intermédiaire	20 à 40% à la naissance puis Hb H (β_4) 3 à 30%	Anémie (Hb 3-12 g/dL) Microcytaire et régénérative
$--/--$	- Hydrops foetalis	100%	Létal

Tableau 3 : Les différentes α -thalassémies et leurs principales caractéristiques

- Hydrops foetalis de Bart's

Correspond au syndrome le plus sévère, il s'agit du tableau clinique associé à l'homozygotie pour la délétion des deux gènes α sur les deux chromosomes 16. Il y a absence totale de synthèse des chaînes α . Les hétérotétramères γ_4 remplacent l'hémoglobine fœtale. L'hémoglobine embryonnaire Portland ($\zeta_2\gamma_2$) est la seule fonctionnelle, le seul transporteur d'oxygène, elle rend possible la survie du fœtus jusque cinq mois de grossesse environ mais ce syndrome est le plus souvent létal.

On observe une hépatosplénomégalie très prononcée, un retard de développement cérébral et staturo-pondéral, une anémie intra-utérine marquée, des déformations cardiaques...

Il existe de rares cas de survie grâce à un diagnostic très précoce et une prise en charge thérapeutique par transfusions in utéro notamment (46) (47).

- Hémoglobinose H

Rencontrée le plus fréquemment chez les patients d'origine asiatique et méditerranéenne. Ces patients auront une production d'Hb A de moins de 30% en général. Les chaînes de globine non- α s'apparient pour former des tétramères γ_4 à la naissance puis des tétramères β_4 de nature relativement instables.

Ces patients vont présenter une anémie hémolytique chronique relativement bien tolérée. Parfois, on peut retrouver un ictère cutanéomuqueux, une splénomégalie, des crises hémolytiques suite à des infections ou traitement, des complications de type lithiase biliaire.

Plus rarement on peut retrouver des formes particulières d'hémoglobinose H, dites « non délétionnelles ». Elles correspondent à l'association d'une délétion des 2 gènes de l' α -globine sur un chromosome 16 et d'une anomalie α_+ (de type mutation, insertion ou petite délétion) sur l'autre chromosome 16. Ces formes présentent en général un tableau clinique plus sévère (48) (49).

- α -thalassémie de type 1

Il s'agit du trait α -thalassémique, deux gènes α sont inactivés. On parle de α^0 -thalassémie hétérozygote : les deux gènes inactivés sont situés sur le même chromosome ($--/\alpha\alpha$) ou de α^+ -thalassémie homozygote ($-\alpha/-\alpha$).

Cliniquement cette forme présente peu de signes notables mis à part une discrète anémie microcytaire.

- α -thalassémie de type 2

Il s'agit d'une α^+ -thalassémie hétérozygote, seul un gène α est inactivé, c'est une forme silencieuse. Cliniquement asymptomatique (parfois discrète microcytose), c'est l' α -thalassémie la plus fréquente.

7. Autres syndromes thalassémiques

- Les $\delta\beta$ -thalassémies et Persistance Héritaire de l'Hémoglobine Fœtale (PHHF)

Ce sont des affections qui touchent simultanément l'HbA et l'HA₂ associées à une expression accrue d'HbF. La distinction entre ces deux pathologies va reposer sur des critères cliniques et biologiques comme l'expression du taux d'HbF nécessaire pour compenser le défaut de

production d'HbA. Les sujets hétérozygotes $\delta\beta$ -thalassémiques auront un taux d'HbF de 5 à 15%, les hétérozygotes PHHF ont des taux plus augmentés de l'ordre de 20 à 30 % (100% chez les homozygotes).

Les $\delta\beta$ -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 : les PHHF délétionnelles résultant de larges délétions des gènes δ et β , les PHHF non délétionnelles stimulant la synthèse d'HbF (délétion au niveau d'un site situé en 5' du gène δ qui joue un rôle majeur dans la répression de l'expression des gènes γ) (Fig.14) (12).

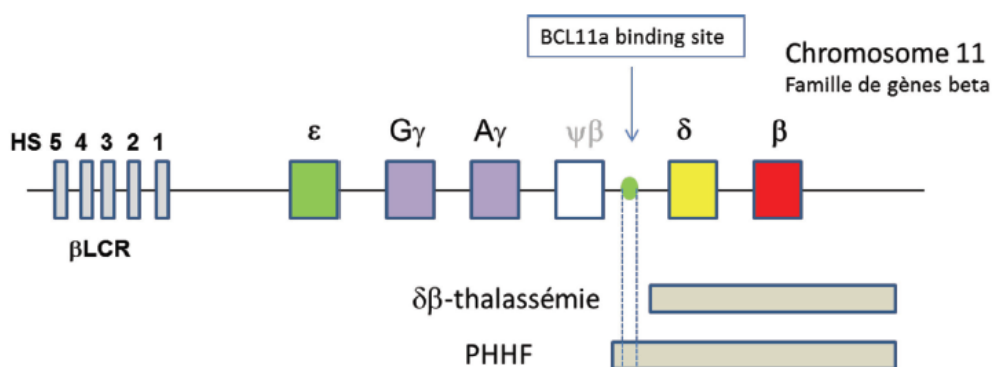


Figure 14 : $\delta\beta$ -thalassémie et PHHF, délétions sur le chromosome 11 (13)

Le tableau clinique de ces différents syndromes thalassémiques est résumé dans le **tableau 4**.

Génotype	Retentissement clinique
Homozygote PHHF/PHHF	Asymptomatique, discrète anémie possible
Hétérozygote composite : PHHF/ β -thal	Variable : d'asymptomatique à l'anémie modérée
Homozygote $\delta\beta$ -thal/ $\delta\beta$ -thal	Variable : de l'anémie modérée à la thalassémie majeure
Hétérozygote $\delta\beta$ -thal/ β -thal	Tableau généralement plus sévère que chez l'homozygote $\delta\beta$ -thal/ $\delta\beta$ -thal

Tableau 4 : Clinique des $\delta\beta$ -thalassémie et PHHF

- Hémoglobine Lepore

Elle est issue d'un crossing-over inégal entre les gènes β et δ . Le produit du gène de fusion est une protéine hybride dont la synthèse est quantitativement réduite car elle est placée sous la dépendance du promoteur faible δ , cette hémoglobine présente donc une propriété β -thalassémique. L'événement réciproque aboutit à la formation d'Hb anti-Lepore, dont la protéine hybride est alors formée de la séquence N-terminale de chaîne de β -globine, et de la séquence C-terminale de la chaîne δ (Fig.15).

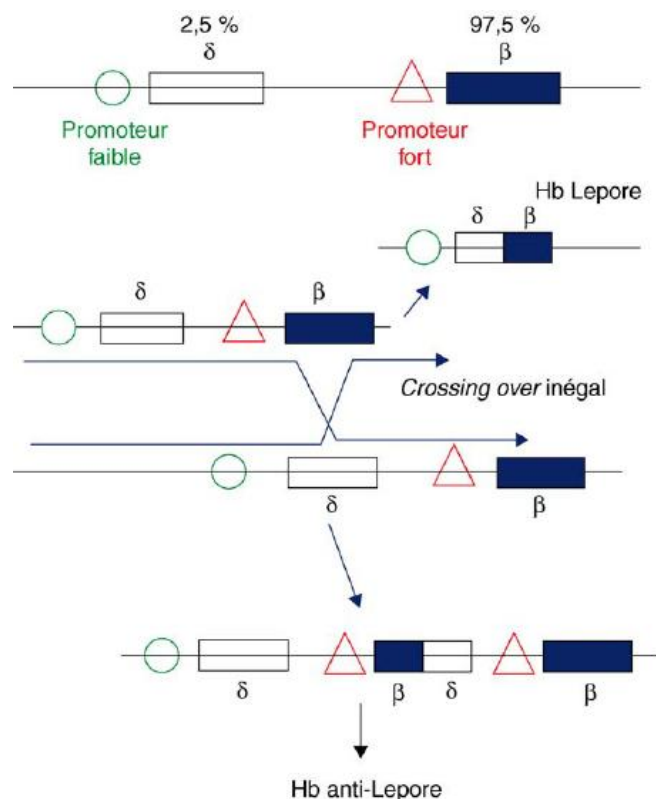


Figure 15 : Mécanisme de formation du variant Lepore (14)

Au niveau clinique, le patient hétérozygote présentera une anémie microcytaire hypochrome et une augmentation de l'HbF, le tableau clinique est celui d'une thalassémie mineure. Chez le patient homozygote, la présentation clinique sera celle d'une thalassémie majeure (anémie de Cooley) (50).

B - Les variants rares d'hémoglobine

La substitution d'acide aminé sur la molécule d'hémoglobine peut aussi affecter des résidus à l'intérieur de la molécule où elle a des conséquences dès lors qu'elle va toucher une zone fonctionnellement importante de la protéine. Ces mutations vont toucher la poche de l'hème, les zones de contact des dimères de globine, la cavité centrale, les sites de fixation de 2-3 BPG (Fig.16) et vont être à l'origine de variants rares responsables de désordres hématologiques variés. Ce sont les variants d'hémoglobines instables et d'hémoglobines hyperaffines qui vont particulièrement intéresser notre propos.

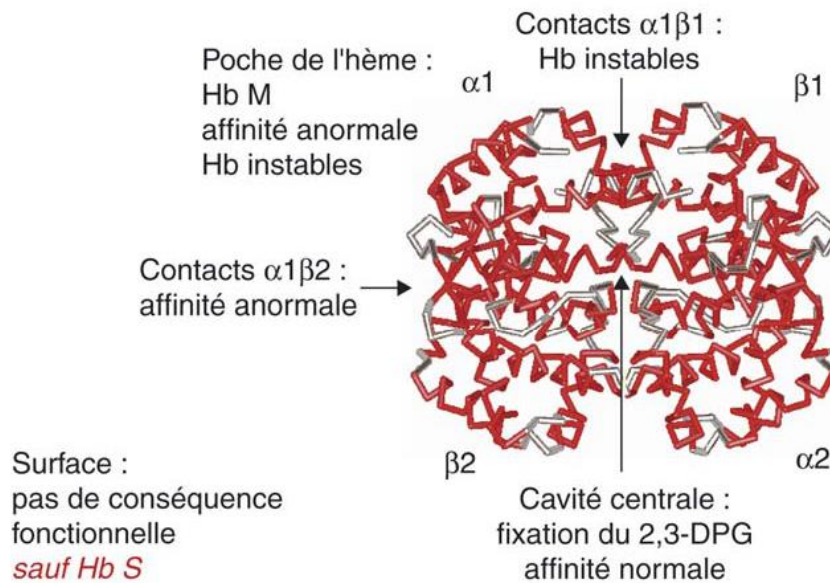


Figure 16 : Topographie des mutations sur le tétramère de globine (12)

1. Les hémoglobines instables

a. Définition et historique

Les hémoglobines instables constituent un groupe particulier et hétérogène d'hémoglobines anormales. Ce sont des variants rares qui vont être responsables d'anémies hémolytiques et caractérisés par la formation de précipités insolubles au niveau de la membrane érythrocytaire : les corps de Heinz.

Les hémoglobines instables sont désignées communément par le nom de la zone géographique ou de la ville dans laquelle le variant a été découvert.

La première description d'anémie hémolytique par hémoglobine instable a été faite en Angleterre chez un enfant ayant eu une cyanose associée à une splénomégalie. L'examen du frottis avait révélé la présence de corps de Heinz dans toutes les hématies, ce syndrome avait à l'époque été désigné comme étant une « anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire », puis d'autres cas similaires ont ensuite été décrits (51).

Les explications biochimiques de ces anomalies n'ont ensuite été élucidées que vingt ans plus tard avec la caractérisation structurale de plusieurs mutations au niveau des chaînes β dans des régions spécifiques de la molécule d'hémoglobine comme dans la poche de l'hème ou au niveau de l'interface α_1 - β_1 (52).

Ainsi, l'hémoglobine Köln a été la première hémoglobine instable identifiée (53).

b. Epidémiologie

Dans les années qui ont suivi la découverte de la première hémoglobine instable, le nombre de variant décrit s'est accru. On compte aujourd'hui environ 150 variants d'hémoglobines instables répertoriés dans la base de données « [http://www.globin gene server](http://www.globin_gene_server) » (2). La plupart concernent les gènes β . Ces mutations responsables d'hémoglobines instables sont retrouvées chez un nombre limité d'individus, on les retrouve dans quelques familles le plus souvent, on parle de mutations « privée » du fait de leur rareté. La transmission se fait selon un mode autosomique dominant le plus souvent mais l'anomalie peut affecter un seul membre de la famille ; les mutations « *de novo* » sont fréquemment observées. Contrairement aux variants d'hémoglobine fréquents que nous avons développés précédemment, aucun avantage sélectif n'a été mis en évidence chez ces patients.

Du fait de l'exploration complète des anémies hémolytiques sans étiologie évidente dans les pays développés, ces variants sont rencontrés fréquemment dans de nombreux pays Européens (France, Espagne, Italie...), en Amérique du Nord et dans plusieurs populations asiatiques (Chine, Japon, Corée...) Parmi les variants identifiés à ce jour, on peut citer l'hémoglobine Köln qui est le variant le plus rencontré ainsi que l'hémoglobine Hammersmith qui a une importance clinique puisqu'il s'agit d'un variant particulièrement instable dont tous les cas décrits sont des mutations « *de novo* » (54). Environ 25% des hémoglobines instables seront responsables d'une anémie hémolytique qui varient d'une anémie légère compensée à des anémies hémolytiques sévères (55).

c. Physiopathologie

• **Les anomalies moléculaires :**

Il s'agit le plus souvent de mutations ponctuelles, à l'origine de la substitution d'un acide aminé par un autre qui provoque une instabilité au sein de la molécule d'hémoglobine. Plusieurs mécanismes moléculaires sont décrits :

➤ Mutations qui affectent la structure secondaire de l'hémoglobine :

Plus de 75% de la molécule d'hémoglobine est sous forme d'hélices alpha, si cette structure en hélices se trouve modifiée la stabilité de la molécule s'en voit affectée. Par exemple, plusieurs variants sont liés à la substitution d'un acide aminé par une Proline. Or, cet acide aminé ne possède pas d'hydrogène sur sa chaîne principale, ne peut donc pas former de liaisons hydrogènes. La proline a donc un rôle déstabilisant pour la création d'hélices alpha (55). On peut citer dans cette catégorie l'hémoglobine Brockton ($\beta 138$ (H16) Ala>Pro) (56).

➤ Mutations qui affectent la structure tertiaire

La stabilité de l'hémoglobine est également en rapport avec sa structure globulaire fortement repliée qui permet de délimiter une « poche » à hème. Cette géométrie permet de minimiser l'exposition à la phase aqueuse des résidus hydrophobes et à l'inverse favorise l'exposition des groupements polaires ionisés.

- **Les mutations au niveau de la poche de l'hème** et notamment au niveau des contacts internes apolaires vont avoir des conséquences fonctionnelles importantes : pénétration d'eau dans les zones internes. Ces mutations peuvent être à l'origine du remplacement d'un résidu apolaire volumineux par un résidu à l'encombrement stérique moindre ; c'est le cas de l'hémoglobine Hammersmith ($\beta 42$ (CD1) Phe>ser). Toute substitution introduisant des résidus polaires dans la poche de l'hème entraîne une grande instabilité.
- **Les Mutations au niveau de la liaison Hème/globine** entraîne également une instabilité, notamment s'il y a substitution au niveau des Histidines distale et proximale. C'est le cas de l'hémoglobine Saint-Etienne ($\beta 92$ F8 His>gln) (7).

➤ Mutations affectant la structure quaternaire

Il s'agit de mutations qui vont affecter les zones de contact entre les chaînes hétérologues de la molécule d'hémoglobine, notamment au niveau de l'interface $\alpha 1-\beta 1$. L'inhibition de la formation de l'hétérotétramère va être responsable de l'accumulation de sous-unités de globine libres instables.

➤ Hémoglobines Hyperinstables

Ces variants précipitent directement après leur synthèse dans l'érythrocyte, ils sont donc difficilement décelables dans l'hémolysat du fait de leur caractère éphémère. Ces mutations concernent le plus souvent le troisième exon du gène de la β globine (57).

Ils auront comme conséquence un syndrome thalassémique à corps de Heinz. Les chaînes β hyperinstables ne peuvent pas s'associer pour former un tétramère avec les chaînes α . Il y a alors précipitation des sous-unités anormales et en parallèle les chaînes α en excès précipitent également et des corps de Heinz se forment (58).

• **Formation d'Hémichromes et de corps de Heinz**

Les hémoglobines instables vont s'oxyder en Méthémoglobine plus rapidement que l'hémoglobine normale (ce caractère est dépendant du type de variant d'hémoglobine instable). De plus, pour les variants liés à une mutation de la poche de l'hème on aura une déshémisation des chaînes anormales du tétramère et formation de « Semi-hémoglobine » qui sont particulièrement instables.

Les hémichromes sont des dérivés de la méthémoglobine et des semi-hémoglobines, ce sont des formes anormales d'oxydation de l'hémoglobine. Ils sont d'abord réversibles puis deviennent irréversibles dans un second temps et alors particulièrement instables (59). Les corps de Heinz proviennent de la précipitation des hémichromes au niveau de la membrane et vont être éliminés avec l'érythrocyte qui a perdu son élasticité lors de son passage dans la rate entraînant une hémolyse plus ou moins sévère.

Le mécanisme d'anémie hémolytique dans les hémoglobines instables repose donc sur la combinaison de deux phénomènes (Fig.17) :

- La séquestration splénique des érythrocytes déformés suite à la précipitation de corps intracellulaires.

- La formation d'ions superoxydes lors de l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine conduisant à des atteintes membranaires du globule rouge.

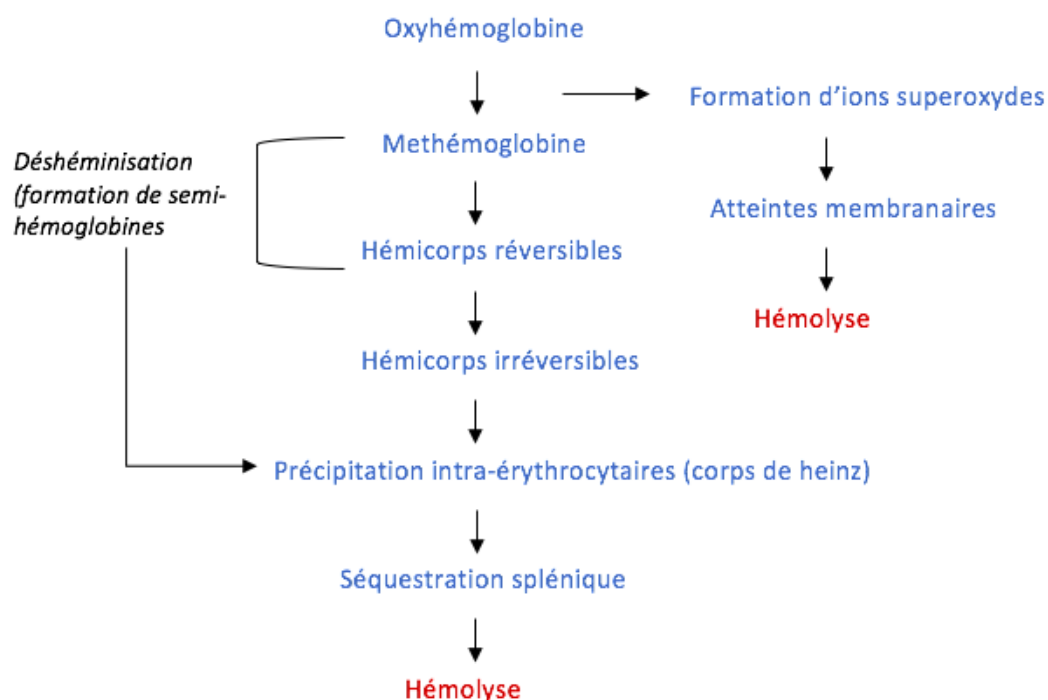


Figure 17 : Physiopathologie des hémoglobines instables

Il faut également noter que lorsque la mutation se situe près de la poche de l'hème, il peut y avoir une altération de la fonction oxyphorique de l'hémoglobine. En effet, une altération structurale peut se répercuter sur les zones impliquées dans le transport, le plus souvent en rompant les liaisons stabilisant la forme désoxygénée.

d. Clinique et prise en charge

Cette partie sera d'avantage développée dans la seconde partie avec l'étude des variants que nous avons identifiés au laboratoire.

Les hémoglobines instables sont responsables de tableaux cliniques hétérogènes, l'anémie pouvant aller d'une forme modérée bien supportée à une forme transfusion dépendante selon le variant. De même pour les crises d'hémolyse et les complications.

Les crises hémolytiques peuvent être déclenchées par la prise de médicaments connus comme étant oxydants, la liste de ces médicaments correspond à celle des produits interdits aux personnes présentant un déficit en G6PD, (cf. liste de l'ANSM disponible en ligne).

Par ailleurs, ces patients peuvent présenter une diminution de la saturation en oxygène du sang artériel ce qui leur confère un aspect cyanosé.

2. Les Hémoglobines hyperaffines

Les second variants rares auxquels nous avons voulu nous intéresser dans cette étude sont les hémoglobines hyperaffines. En effet, la recherche de causes constitutionnelles de polyglobulies connaît un regain d'intérêt. Le nombre de demande de recherche d'hémoglobine hyperaffine est en augmentation bien qu'il s'agisse toujours de variants rares.

a. Définition

Les hémoglobines à affinité augmentée pour l'oxygène sont la cause la plus fréquente de polyglobulie constitutionnelle, elles précèdent les autres causes héréditaires plus exceptionnelles comme les mutations du récepteur à l'EPO, les mutations des gènes codant les protéines des voies de réponse à l'hypoxie et le déficit en 2-3 DPG (59).

Ce sont des anomalies de transmission autosomique dominante, il a été décrit des cas de mutations *de « novo »*. Ce sont des variants rares qui concerneraient (pas de base de données disponible) une centaine de personnes en France (60). Nous verrons que ce nombre tend à augmenter, ces variants étaient jusqu'alors sous-diagnostiqués. Il y a à ce jour une centaine de variants hyperaffins qui ont été rapportés dans la base de données internationale (2). Tout comme les hémoglobines instables elles sont nommées par le nom de la ville où la découverte a été faite.

Le premier variant rapporté en 1966 est un cas d'érythrose rencontré chez un patient de 81 ans qui présentait un taux d'hémoglobine à 19,9 g/dL et une bande anormale d'hémoglobine à l'électrophorèse (61). L'analyse structurale révélera qu'il s'agit d'un variant de la chaîne alpha ; hémoglobine Chesapeake (62). Ce n'est que bien plus tard qu'on découvre les deux conformations de l'hémoglobine nécessaires à la fonction oxyphorique ; hémoglobine T « tendue » de faible affinité pour l'oxygène et l'hémoglobine R « relâchée » à forte affinité.

Il faut souligner que l'un des paramètres important dans la découverte d'une hémoglobine hyperaffine est la diminution de la P_{50} avec un décalage de la courbe de dissociation vers la gauche (Fig.18).

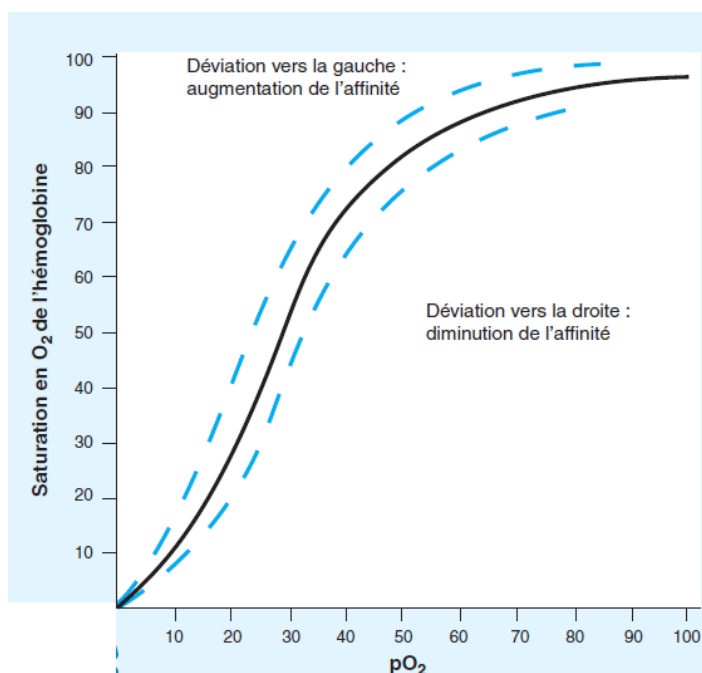


Figure 18 : Décalage de la courbe de dissociation vers la gauche : augmentation de l'affinité (63)

b. Physiopathologie

• Mécanisme conduisant à la polyglobulie

L'augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est à l'origine d'une altération de la délivrance de cet oxygène aux tissus, cela provoque une hypoxie tissulaire notamment au niveau rénal. Dans le rein, les facteurs induits par l'hypoxie (HIF) vont agir comme des facteurs de transcription et activer la synthèse d'EPO entraînant une stimulation de l'érythropoïèse à l'origine d'une érythrose et d'une augmentation de la concentration en hémoglobine.

La seconde adaptation physiologique à l'hypoxie est l'augmentation du flux sanguin (64).

- **Lésions moléculaires des variants hyperaffins (65)**

- **Mutation au niveau des régions directement impliquées dans la transition T→R**

Ces mutations vont entraîner une déstabilisation de la forme T (de faible affinité pour l'O₂). Les mutations sont retrouvées au niveau de la zone de contact α_1 - β_2 ou α_1 - α_2 ou encore dans la région C-terminale du gène de la β -globine. Les mutations dans ces régions sont à l'origine des variants responsables d'une augmentation très élevée de l'affinité et d'une coopérativité nettement diminuée entre les sous-unités de globines.

Par exemple, la zone de contact α_1 - β_2 connecte les dimères α_1 - β_1 et α_2 - β_2 le contact principal dans cette zone se fait entre la Tyr α 42 (C7) et Asp β 99 (G1), la substitution de l'acide aspartique en position β 99 sur la chaîne β est à l'origine de différents variants (Fig.19).

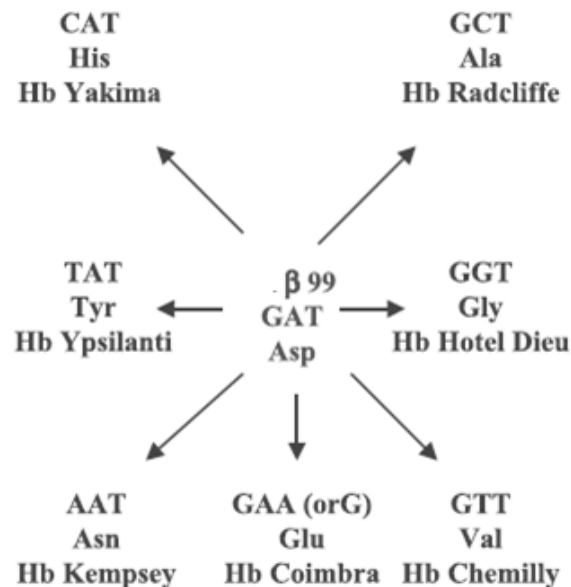


Figure 19 : Substitution de l'acide aspartique en β 99 (65)

- **Mutations réduisant l'affinité pour le 2-3 DPG**

Le 2-3 DPG se fixe dans la cavité centrale de la désoxyhémoglobine et diminue l'affinité de l'hémoglobine pour l'O₂ en stabilisant la forme T.

Une augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est observée lorsque les sites de fixation His β 143 ou Lys β 82 sont substitués, cela entraîne une modification structurale qui diminue l'interaction avec le 2-3DPG. Les porteurs de ce genre de variant auront une polyglobulie modérée.

– Mutations affectant la poche de l'hème

Les résidus aromatiques du site proximal de l'hème comme la phénylalanine ont un rôle important dans le maintien de son orientation. Lorsque ce résidu est substitué, l'affinité pour l'O₂ augmente (exemple dans l'hémoglobine Saint-Nazaire la phénylalanine est substituée par une isoleucine).

En revanche, les substitutions au niveau du site distal de l'hème (site de fixation de l'oxygène) entraînent des désordres moins sévères (hémoglobine hyperaffine peu symptomatique comme l'Hb Poitiers ou hypoaffine comme l'Hb Calais).

Il faut noter que 34% des variants hyperaffins vont aussi présenter une instabilité responsable d'anémie hémolytique et des complications liées à l'hémolyse que l'on verra (64).

c. Clinique et prise en charge

Les complications engendrées par la polyglobulie et leur prise en charge seront développées dans la seconde partie de l'étude où nous nous intéresserons plus particulièrement aux variants que nous avons mis en évidence au laboratoire.

3. Autres variants rares

a. Les Hémoglobines hypoaffines

Ce sont des variants à l'origine d'une diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. La courbe de dissociation va alors être déviée vers la droite. A l'heure actuelle peu de variants ont été décrits (environ 50 répertoriées dans la base de données internationales en ligne).

Pour ces hémoglobinopathies, la délivrance d'oxygène aux tissus est favorisée ce qui entraîne une diminution de la synthèse d'EPO et par conséquent une discrète anémie. Parfois, si l'affinité est très abaissée on peut observer cliniquement une cyanose du fait de la désaturation importante. C'est le cas pour l'Hb Kansas ($\beta 102 \text{ Asn} > \text{Thr}$) qui a été la première décrite dont la mutation affecte la transition R \rightarrow T déstabilisant l'état relâché « R » de l'hémoglobine de forte affinité pour l'O₂.

Le diagnostic de l'hémoglobine hypoaffine va se faire après élimination des autres causes de cyanose comme une exposition à des toxiques, des anomalies cardiaques ou pulmonaires, mais une fois le diagnostic posé, un traitement spécifique est rarement mis en place.

b. Les Hémoglobines M

Ce sont les premières hémoglobinopathies qui ont été décrites. Ce sont des variants de transmission autosomique dominante pour lesquels la mutation va entraîner l'oxydation de l'atome de fer de l'hème en Fe^{3+} , forme incapable de fixer l'oxygène. Il s'agit donc d'une forme anormale de méthémoglobine pour laquelle un type de chaîne mutée est à l'état Fe^{3+} et l'autre type de chaîne normale est à l'état Fe^{2+} .

Les mutations à l'origine de ces maladies touchent le plus souvent des acides aminés qui se trouvent à des positions importantes dans la poche de l'hème (site distal, site proximal...). Elles peuvent toucher les gènes des chaînes α ou β voire même γ (dans ce cas on aura une résolution spontanée avec la disparition de l'Hb F au profit de l'Hb A).

Au niveau clinique, les patients vont présenter une cyanose isolée au niveau cutanéomuqueux dès la naissance si la mutation concerne les chaînes α , ou plus tardivement si ce sont les chaînes β qui sont touchées. En général cette cyanose ne nécessite pas de traitement spécifique (66).

**METHODE D'ETUDE DE
L'HEMOGLOBINE AU
LABORATOIRE DU CHRU DE
LILLE**

Nous verrons les circonstances de demande de diagnostic et l'anamnèse des hémoglobines hyperaffines et instables dans la troisième partie où nous nous intéresserons plus en détail à ces variants identifiés au laboratoire.

Nous allons ici développer les techniques qui ont permis de faire leur diagnostic puis nous analyserons les résultats et leurs conséquences dans la prochaine partie.

I. Recherche d'une Anomalie de l'hémoglobine (RAHB)

1. Pré-analytique

La recherche d'une anomalie de l'hémoglobine (RAHB) se fait sur un prélèvement de sang total prélevé sur anticoagulant (EDTA). Un volume de 5 ml est suffisant pour les méthodes classiques (500 µL pour les tubes pédiatriques). L'échantillon de sang se conserve à +4°C au maximum huit jours mais idéalement l'échantillon doit être traité rapidement pour éviter les erreurs d'interprétation et la formation de méthémoglobine. Pour les techniques classiques électrophorétiques il faut préparer un hémolysat à partir du sang total pour qu'il soit débarrassé des protéines plasmatiques et des stromas globulaires. Puis les globules rouges sont lavés et le mélange est centrifugé (3000 tours/min environ 10 min) et le surnageant est éliminé (élimination des leucocytes notamment).

Il est recommandé de réaliser la RAHB à distance de toute transfusion (3 mois minimum). Les prélèvements envoyés au laboratoire doivent impérativement être accompagnés d'une fiche de demande d'examen comportant les renseignements indispensables à l'interprétation des résultats : origine des parents, grossesse en cours, hémogramme, bilan martial (**Annexe 1**).

2. Techniques de première intention

Les stratégies diagnostiques sont certes fonction de l'équipement de chaque laboratoire, mais la nomenclature actuelle précise que la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine doit se faire par au moins une technique d'électrophorèse et deux autres tests pour un résultat diagnostique d'orientation (N° d'ordre de la nomenclature : 1120). La pratique d'une seule technique n'est pas recommandable, en effet, en CLHP par exemple plusieurs mutants sont co-élués avec l'Hb A, l'Hb A2 ou l'Hb F. De plus, un profil normal quel que soit le système utilisé ne permet pas d'éliminer un variant de l'hémoglobine. La complémentarité des méthodes est importante et indispensable avant de rendre une interprétation.

Au laboratoire du Centre de Biologie Pathologie de Lille, les 3 techniques de première intention utilisées sont l'électrophorèse capillaire (Capillarys 2 Flex Piercing, SEBIA), la Chromatographie Liquide Haute Performance (G8 Tosoh, CLHP) et l'isoélectrofocalisation.

a. Electrophorèse capillaire

• **Principe de la méthode : Rappels**

C'est une technique d'électrophorèse liquide où la migration se fait dans un capillaire de silice rempli d'une solution tampon qui plonge dans deux réservoirs contenant cette même solution. Ces cuves vont être reliées à une électrode connectée à un générateur de courant (Fig.20). Suite à l'injection de l'hémolysat dans le système et à l'application du courant électrique, les différentes fractions de l'hémoglobine vont se séparer en fonction de leur mobilité électrophorétique (donc de leur charge) mais aussi en fonction du courant d'électroendosmose (donc de leur rapport charge/masse). Les hauts voltages appliqués permettent une séparation rapide et sensible des différentes fractions (67).

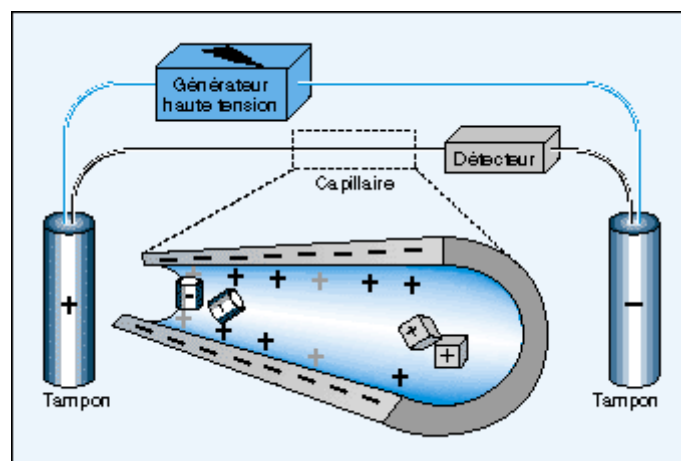


Figure 20 : Principe de l'électrophorèse capillaire (67)

• **Le capillarys 2 Flex Piercing- SEBIA**

Le capillarys permet la réalisation de 8 analyses en parallèle grâce à une série de 8 capillaires. La dilution des échantillons dans la solution hémolysante est directement réalisée par l'automate puis l'injection de l'échantillon dans les capillaires est effectuée par aspiration à l'anode. La séparation des différentes hémoglobines présentes dans l'échantillon se fait

ensuite en appliquant une différence de potentiel de plusieurs milliers de volts aux bornes de chaque capillaire. La détection s'effectue par spectrophotométrie à 415 nm (maximum d'absorption de l'oxyhémoglobine).

Un électrophorégramme est généré avec les différentes fractions d'hémoglobine « normale » et les fractions anormales de mutants. Le résultat est donc rendu de façon très lisible et compréhensible. L'électrophorégramme est découpé en 15 zones, chaque zone correspondant à un temps de rétention donné et donc à un nombre de variants limités. Une bibliothèque des variants mise à jour régulièrement est d'ailleurs fournie par le laboratoire SEBIA pour savoir quel variant migre dans telle zone. Une quantification relative des différentes fractions est réalisée (Fig.21).

Il y a toujours en parallèle du passage des échantillons, un passage des contrôles : contrôle A₂ normal en début et en fin de série et un contrôle AFSC pour chaque série.

Cette technique présente l'avantage d'être rapide, automatisée, reproductible et quantitative avec des tracés simples à interpréter (68).

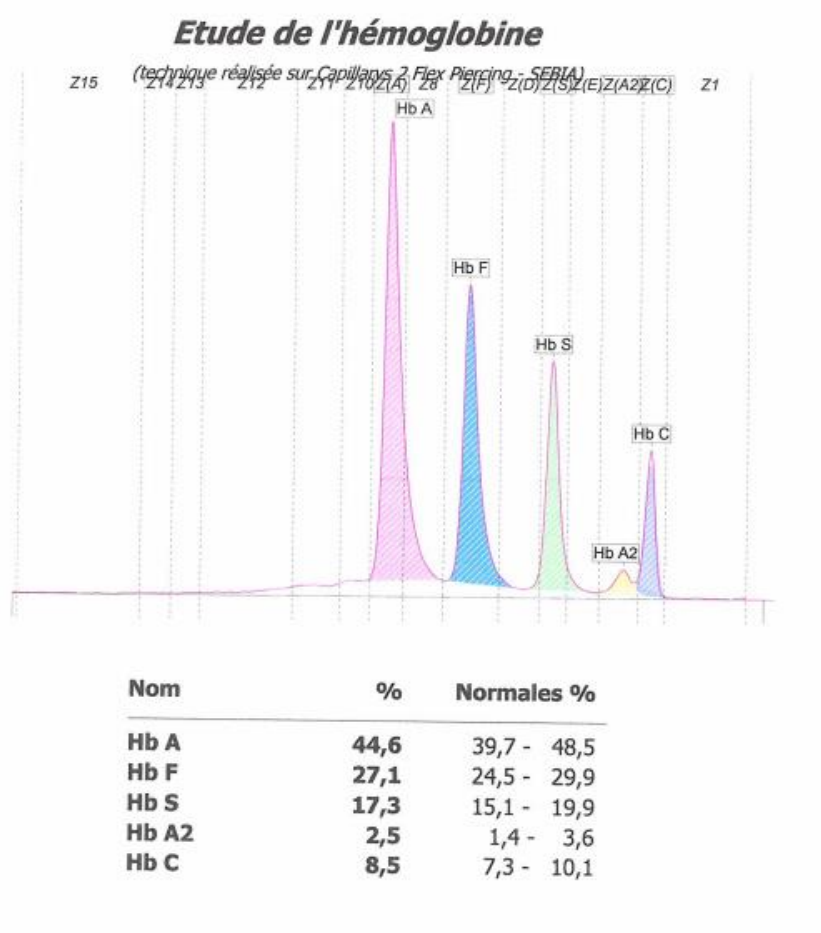


Figure 21 : Electrophorégramme du Capillarys 2 Flex, contrôle AFSC

b. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

• **Principe de la méthode :**

La CLHP permet de séparer les constituants d'un mélange selon la force de leurs interactions ioniques sur une colonne échangeuse de cations. Un fluide contenant les fractions à séparer (la phase mobile) parcourt une colonne greffée d'une certaine charge (la phase stationnaire) (Fig.22).

Les molécules d'hémoglobines sont chargées positivement dans le tampon utilisé (Phase mobile) et vont interagir avec la colonne chargée négativement (résidus carboxyles greffés sur une résine (phase stationnaire). Suite à l'injection d'un gradient de tampon de haute force ionique, les différentes fractions d'hémoglobines sont éluées au fur et à mesure que la force ionique du tampon devient supérieure à leur interaction avec la colonne. Ces différentes fractions sont éluées à un temps donné qui est caractéristique : c'est le temps de rétention. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. La détection est spectrophotométrique (69).

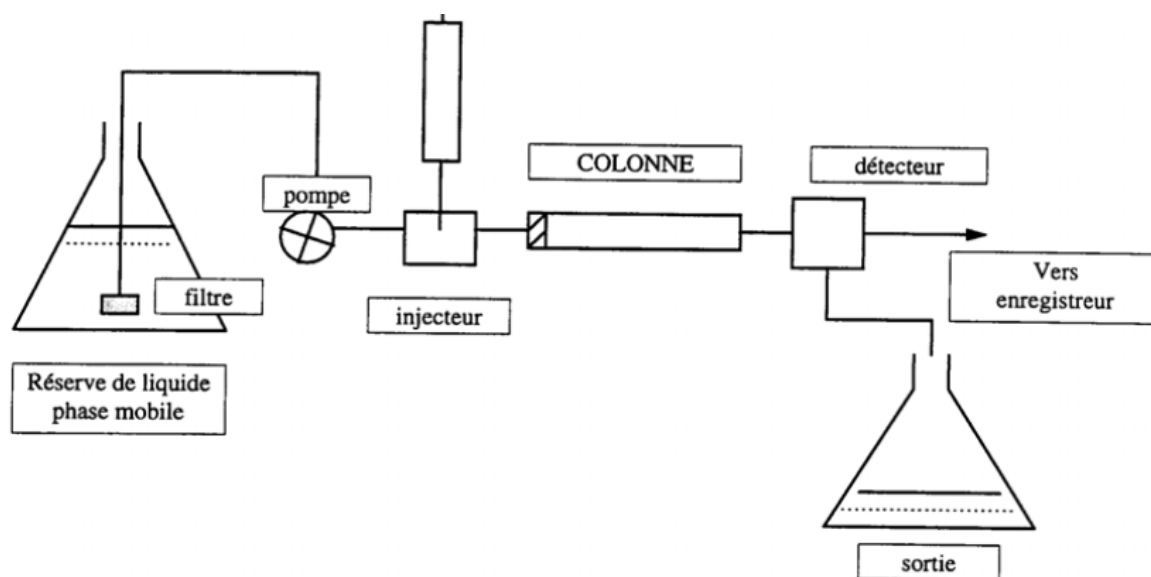


Figure 22 : Principe de fonctionnement de la CLHP

• **G8 Tosoh, Biosciences**

L'automate TOSOH G8 de Biosciences est basé sur le principe de la CLHP à échanges de cations. Il permet de séparer les différentes hémoglobines notamment pour la RAHB mais il est également utilisé pour le dosage en urgence des HbS, HbC, HbF ou HbH. En effet, les

HbA2 et HbF sont rapidement séparées suite à leur différence de charge ionique et éluées à des temps de rétention différents au cours d'un cycle qui dure 6 minutes.

Un gradient d'éluion composé de trois tampons de concentrations salines différentes est utilisé pour la séparation des hémoglobines. L'absorbance est mesurée par le détecteur en sortie de colonne à 415 et 690 nm et on obtient le chromatogramme.

Les différents pics obtenus sont donc reconnus en fonction de leur temps de rétention ; les hémoglobines normalement présentes HbA, HbA2 et HbF ainsi que les variants d'hémoglobine les plus fréquents sont reconnus de façon présomptive. Une quantification des différentes fractions est réalisée par calcul de l'aire sous la courbe par rapport à l'aire totale du chromatogramme (Fig.23). Pour les HbA2 et HbF, la quantification se fait à partir d'une calibration (Il faut s'assurer que la quantification des contrôles de qualité interne est correcte). Il s'agit d'une technique automatisée, rapide, reproductible et quantitative, elle permet une quantification rapide de Hb A2 et Hb F et une identification des principaux variants. Il faut noter que l'Hb E est co-elué avec l'Hb A2 (70).

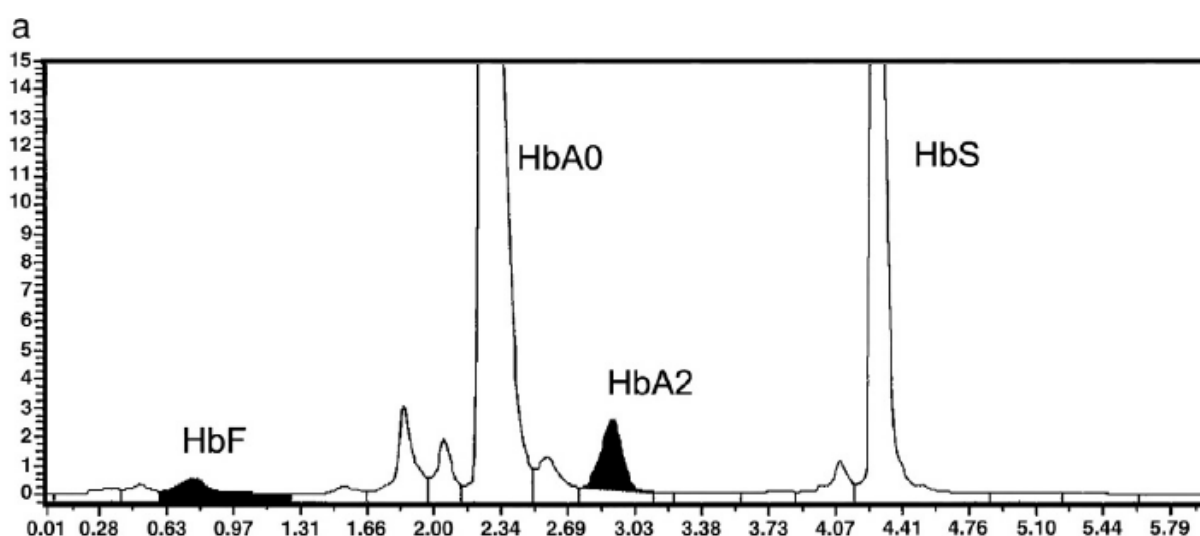


Figure 23 : Chromatogramme obtenu avec l'échantillon d'un patient présentant une Hb S

c. Isoélectrofocalisation (IEF)

La troisième technique utilisée pour la RAHB au laboratoire est l'isoélectrofocalisation ou focalisation isoélectrique. Il s'agit d'une méthode d'électrophorèse sur gel qui utilise un gradient de pH6 à pH8 sous voltage élevé. La migration et donc la séparation des variants d'hémoglobine se feront en fonction de leur point isoélectrique ou pI. Pour rappel, le pI d'une molécule est le pH pour lequel la charge globale de la molécule est nulle, on dit alors qu'elle

est sous forme zwitterionique. Les différentes hémoglobines vont donc migrer dans ce gradient de pH jusqu'à ce que celui-ci atteigne leur pI. L'identification d'un mutant inconnu se fera par comparaison de son pI avec celui d'un échantillon de référence. Il est ainsi possible de séparer deux variants d'hémoglobine qui diffèrent de 0.01 unité de pH. Par exemple les pI de l'HbA1 et de l'HbA2 sont respectivement de 6,98 et 7,42, celui de l'HbS est de 7,20 (71).

Au laboratoire les IEF sont réalisées par série de 24 prélèvements accompagnés d'un contrôle (déposé 2 à 3 fois), cela permet d'étudier un grand nombre d'échantillons en simultané. C'est une technique qui présente l'avantage d'utiliser du sang total et qui nécessite peu d'échantillon (20 µL). Elle bénéficie d'un pouvoir de résolution élevé.

Mais c'est une technique qui reste manuelle et l'interprétation des résultats nécessite une certaine maîtrise. C'est une technique qui est seulement qualitative, on ne peut pas quantifier les variants identifiés (Fig.24).

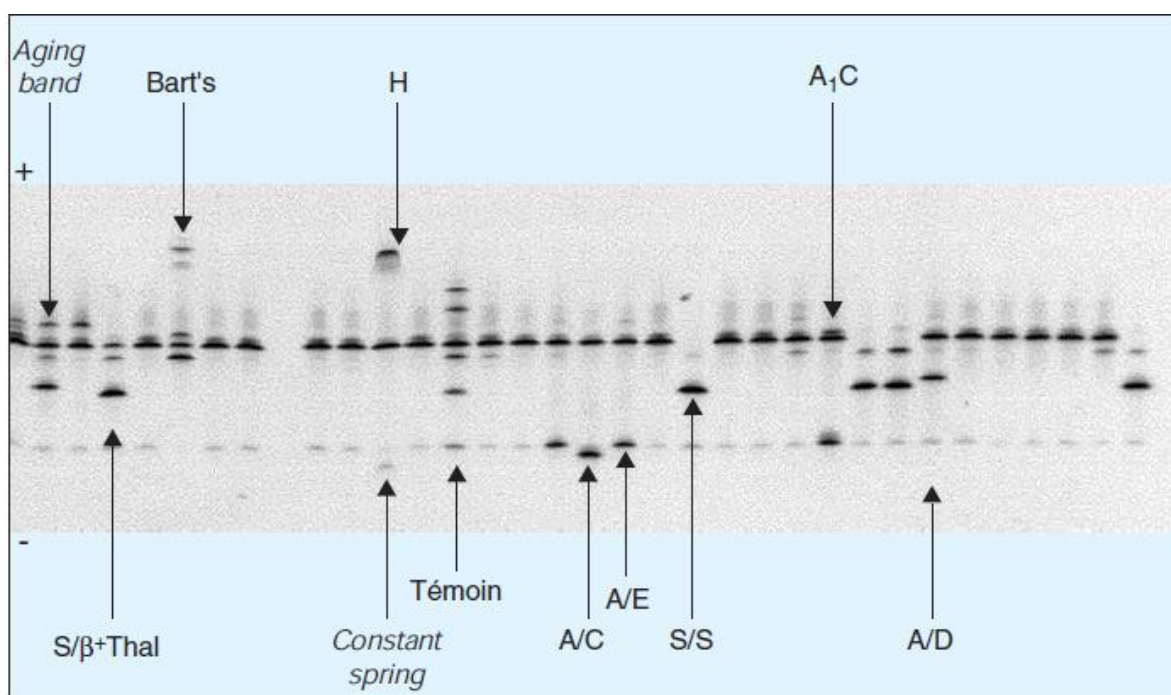


Figure 24 : Isoélectrofocalisation (71)

En conclusion, on peut dire que l'électrophorèse capillaire permet le diagnostic de nombreux variants plus ou moins rares, elle tient une place importante dans l'identification des variants notamment de par sa simplicité d'utilisation, sa rapidité et son excellente résolution. Cependant, certains variants et en particulier les variants rares auxquels nous nous intéressons

restent non détectables d'où la nécessité d'avoir recours à plusieurs techniques pour obtenir un diagnostic fiable.

Les variants d'hémoglobines instables et hyperaffines vont également nécessiter une étude moléculaire afin d'identifier les mutations ainsi que des techniques particulières biochimiques et hématologiques.

II. Techniques complémentaires dans le diagnostic des hémoglobines hyperaffines et instables

1. Hémoglobine hyperaffine

a. Mesure de la PO₂50

La mesure de la PO₂50 est utilisée à Lille dans le cadre de la recherche d'une hémoglobine hyperaffine. Cette technique est utilisée par 50% des laboratoires de référence dans la démarche diagnostic (72).

Au Centre de Biologie Pathologie du CHRU de Lille, la mesure se fait par estimation sur un appareil à gaz du sang ABL 800 Flex de Radiometer. La PO₂50 est calculée pour un pH à 7,40 une FCOHb=0 et une FMetHb=0. L'équation utilisée pour l'estimation est la suivante : (manuel de référence ABL 800 Flex)

$$p50(T) = \frac{P}{1 + \frac{FCOHb}{0.5 \times (1 - FCOHb - FMetHb)}}$$

La mesure se fait sur sang total, sur une seringue ou un tube hépariné de 5 ml mais les causes d'erreurs sur sang total sont multiples (pH anormal, taux de 2-3 DPG diminué, HbCO chez les fumeurs, oxydation due aux mauvaises conditions de conservation...) C'est pourquoi, le prélèvement sanguin doit-être acheminé dans les plus brefs délais dans la glace au laboratoire (impérativement dans l'heure qui suit le prélèvement).

La spécificité de cette technique est de l'ordre de 80%, par contre, elle possède une sensibilité médiocre (env. 5%) (Résultats obtenus par comparaison de 50 échantillons de patients polyglobuliques avec une autre méthode : tonométrie, qui n'est plus utilisée aujourd'hui) (73). Cependant, cette technique permet une estimation rapide, simple et peu coûteuse de la P50 et

peut être un allié important pour la détection des hémoglobines hyperaffines dont le diagnostic est long et difficile. Elle est toujours réalisée en parallèle de la RAHB et doit impérativement être accompagnée de la fiche de renseignements clinico-biologiques.

A Lille, elle constitue la première étape diagnostique d'une hémoglobine hyperaffine en parallèle de la RAHB avant d'entreprendre le séquençage du gène HBB puis HBA1 et HBA2. Une biologie moléculaire sera systématiquement demandée lors d'une diminution de la P50. Lorsqu'elle est normale, le séquençage des gènes sera étudié au cas par cas et en tenant compte des données clinico-biologiques du patient (polyglobulie persistante ? Elimination des autres causes de polyglobulie ? Complications liées à la polyglobulie ?). Dans d'autres laboratoires de référence, la mesure de la P₅₀ ne sera pas du tout réalisée en première intention dans la démarche diagnostique mais sera plutôt un complément de la biologie moléculaire.

2. Hémoglobines instables

a. Test d'instabilité à l'isopropanol

Le test d'instabilité de l'hémoglobine est basé sur le fait que les forces de cohésion internes de la molécule diminuent dans un milieu apolaire. Le test à l'isopropanol est le test de référence. Le protocole suivi est celui décrit par Carrel et Kay (74).

– Pré-analytique :

Le pré-analytique tient une place importante dans la réalisation et la réussite de ce test. Devant une suspicion d'hémoglobine instable (anémie hémolytique, étude familiale...) le service téléphone au laboratoire 24h avant le test (temps nécessaire à la préparation des réactifs) pour prendre un rendez-vous. Suite, à la conversation téléphonique, le laboratoire envoie le protocole à suivre pour la recherche d'une hémoglobine instable.

Le test est obligatoirement réalisé sur du sang frais sur tube EDTA (2 tubes) réceptionné impérativement dans les 3 heures maximum qui suivent le prélèvement. L'échantillon patient doit toujours être accompagné de celui d'un échantillon normal qui servira de témoin négatif (sang le plus frais possible et quantité la plus importante possible).

– Principe :

On réalise dans un premier temps une hémolyse à +4°C ; 200µL de culot globulaire sont mélangés avec de l'eau PPI, il est primordial que le taux d'hémoglobine soit mesuré au

laboratoire d'hématologie car l'hémolysat doit être à la concentration de 4% exactement et doit être limpide.

Après plusieurs temps de repos et de centrifugation, dans un tube à hémolyse en verre on mélange successivement 1 ml d'eau PPI, 1,25 ml de solution de Tris-isopropanol et 250 μ L d'hémolysat à 4%. Les échantillons patients et témoin sont ensuite incubés à 36°C. Le tube témoin doit rester clair jusqu'à 50 min d'incubation. Si l'hémoglobine à tester est instable, la solution devient trouble dans les 5 min après incubation et le précipité floccule à la 20^{ème} minute (Fig.25).

Il s'agit d'une technique longue et dont l'interprétation est très difficile qui nécessite au moins deux opérateurs pour l'interprétation visuelle (opérateur dépendante). La concentration d'hémoglobine doit être rigoureusement déterminée. Il existe des faux positifs : La méthémoglobine en quantité appréciable peut donner des réactions faussement positives, l'HbS, l'HbF et l'HbC commencent à précipiter à partir de la 30^{ème} minute, précipitation des protéines non héminiques chez les patients ayant une forte réticulocytose. On peut aussi avoir des faux négatifs avec les hémoglobines hyper instables, échantillons non conformes... Enfin, il existe des variants légèrement instables *in vitro* sans retentissement hématologique ou clinique.

Ce test est utilisé dans le cadre d'une démarche diagnostic d'une hémoglobine instable en parallèle de la RAHB, de la biologie moléculaire et plus ou moins de la recherche de corps de Heinz.

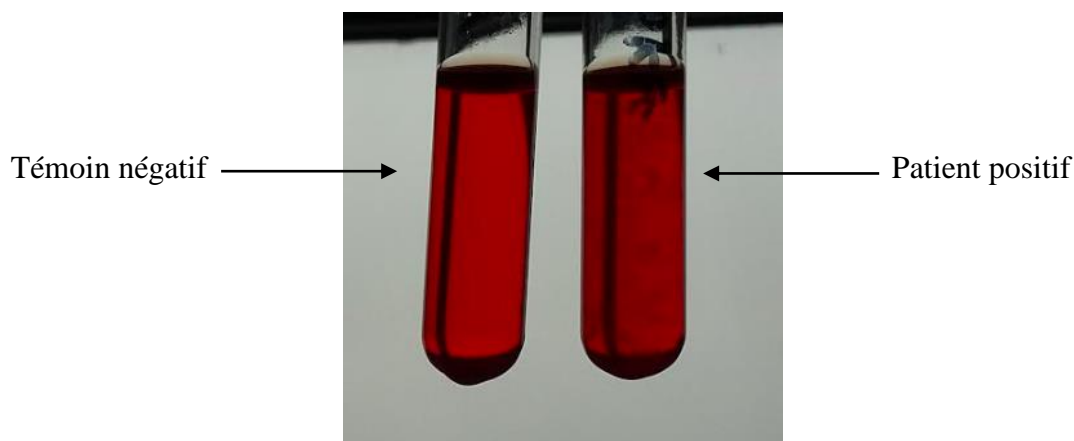


Figure 25 : Test d'instabilité positif réalisé au laboratoire

b. Recherche de corps de Heinz

Cette recherche est effectuée en cytologie dans le secteur d'hématologie du laboratoire dans le cadre d'une suspicion d'hémoglobine instable en parallèle de la RAHB, plus ou moins du test d'instabilité à l'isopropanol et de la biologie moléculaire. Les corps de Heinz, comme nous l'avons vu dans la physiopathologie des hémoglobines instables, sont en fait une précipitation d'hémoglobine dénaturée au niveau de la membrane de l'érythrocyte (semi-hémoglobine, hémichromes).

La recherche s'effectue sur sang total prélevé sur tube EDTA, l'acheminement au laboratoire doit être le plus rapide possible (il faut noter l'heure de prélèvement sur le tube). La détermination de la présence de corps de Heinz s'effectue par observation d'un frottis sanguin coloré au bleu de crésyl brillant incubé pendant 1h à 37°C. La recherche se fait toujours en parallèle de celle d'un témoin négatif. La coloration habituelle permettant de réaliser les formules sanguines (May-Grunwald-Giemsa) ne permet pas la mise en évidence de ces corps. Les corps de Heinz apparaissent comme des petites tâches bleutées au niveau de la membrane, on parle d'hématies en « balle de golf » (Fig.26).

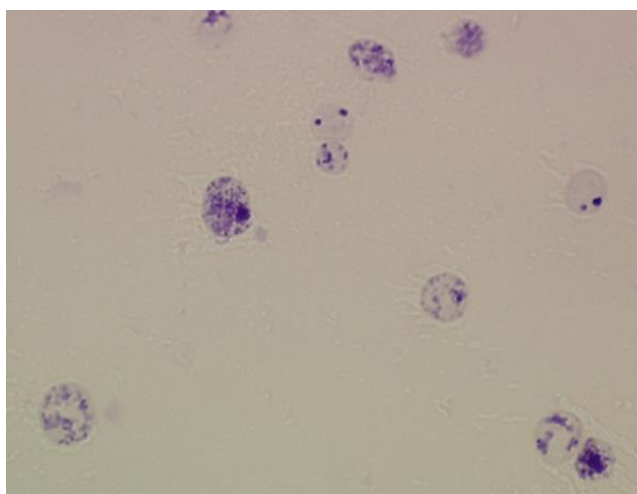


Figure 26 : Corps de Heinz sur frottis sanguin (collection photos laboratoire hématologie CHRU Lille)

Les corps de Heinz ne sont pas toujours visibles dans le sang périphérique des patients avec hémoglobine instable surtout si la fonction splénique est intacte. En revanche, après splénectomie on les observe souvent sur sang frais. C'est pourquoi, la recherche peut être spontanée (étalement de sang frais) ou provoquée. Dans ce dernier cas, on ajoute au

prélèvement de l'acétylphénylhydrazine. La recherche de corps de Heinz est positive quand plus de 30% des globules rouges sont positifs.

La crise hémolytique chez le patient déficitaire en G6PD ainsi que l'hémoglobine H sont également à l'origine de la formation de corps de Heinz (dans ce cas ils apparaissent plus petits que lors d'une hémoglobine instable) (75).

3. Identification du variant rare par biologie moléculaire

L'analyse moléculaire est prépondérante dans la recherche des hémoglobines hyperaffines et instables puisqu'elle confirme ou infirme le diagnostic dans quasiment tous les cas.

Dans notre laboratoire, nous réalisons en 1^{ère} intention le séquençage des gènes HBB. En effet, l'examen des données recueillies sur la base de données Hbvar montre que 80% des variants hyperaffins (78/99 variants) et des variants instables (116/147 variants) sont liés à des mutations du gène β . Nous utilisons la méthode de séquençage de Sanger. Le séquençage des gènes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ est réalisé en seconde intention par le Dr Serge Pissard au Pôle Biologie Pathologie, Département de génétique du CH Henri Mondor à Créteil.

Principe de la méthode du séquençage du gène HBB :

- **Extraction de l'ADN**

Le but est d'extraire l'ADN à partir de tubes de sang prélevés sur EDTA avec le robot CHEMAGIC-STAR. Grâce à cette technologie, tous les ADN seront extraits de la même façon (qualité et quantité homogènes).

- Lyse des cellules :

Les échantillons vont être lysés à l'aide d'un tampon de lyse (Chlorure de Guanidinium 30-45%) qui casse les membranes cellulaires et nucléaires et de la protéinase K qui digère les protéines et les inhibiteurs de PCR.

- Fixation de l'ADN sur billes magnétiques

L'ADN est attaché aux billes grâce à un tampon de fixation ce qui permet de l'extraire des débris cellulaires (tampon = Perchlorate de sodium 20-40% dissous dans de l'éthanol à 40-50%).

➤ Lavage de l'ADN :

L'ADN couplé aux billes est lavé dans divers tampons de lavage afin d'éliminer les impuretés.

➤ Elution de l'ADN :

Grâce à un tampon d'éluion qui brise les liaisons ADN/billes magnétiques.

- **Extension de l'ADN**

Permet d'amplifier de manière strictement indépendante les chaînes sens et anti-sens de l'ADN du fragment étudié. Cette étape est indispensable avant d'étudier les séquences au séquenceur. Après l'amplification on réalise une étape de purification afin d'éliminer les impuretés, les sels et les amorces en excès.

- **Réaction de séquence**

La réaction de séquence à proprement dit consiste en une synthèse d'ADN in vitro. Celle-ci se fait à partir d'un brin matrice recopié par une ADN polymérase à partir d'une amorce fixée spécifiquement et complémentaire du brin matrice. Elle est réalisée sur les 2 brins d'ADN (utilisation d'une amorce sens et anti-sens), cela permet de contrôler la présence d'une variation nucléotidique et de la différencier d'une éventuelle erreur commise par l'ADN polymérase. On utilise le « 3130XL DNA », applied Biosystems 16 capillaires comme séquenceur automatique.

L'ADN polymérase incorpore des déoxyribonucléotides (dNTP) libres présents dans le milieu réactionnel. On trouve aussi dans ce milieu des dideoxyribonucléotides (ddNTP) marqués par un fluorochrome dont l'incorporation stoppe la synthèse d'ADN (pas de liaison phosphodiester possible).

La synthèse d'ADN se fait de façon complémentaire à la matrice initiale, la réaction de séquence étant réalisée à partir d'un très grand nombre de copies de cette matrice (amplification préalable indispensable), l'incorporation aléatoire des ddNTP conduit à l'incorporation à toutes les positions possibles sur le segment d'ADN.

Les fragments néosynthétisés sont ensuite séparés sur un gel de polyacrylamide contenu dans les capillaires du séquenceur automatique. Un laser excite les 4 fluorochromes (qui émettent à des longueurs d'ondes différentes) associés à chacun des ddNTP présents dans le fragment élué. La longueur d'onde de fluorescence réémise permet d'identifier la base correspondante.

Après analyse par l’algorithme du séquenceur, un électrophorégramme est obtenu composé de 4 pics de couleurs différentes correspondant aux 4 bases différentes. L’électrophorégramme obtenu pour le patient est comparé à celui d’un sujet contrôle ou à une séquence de référence (Fig.27).

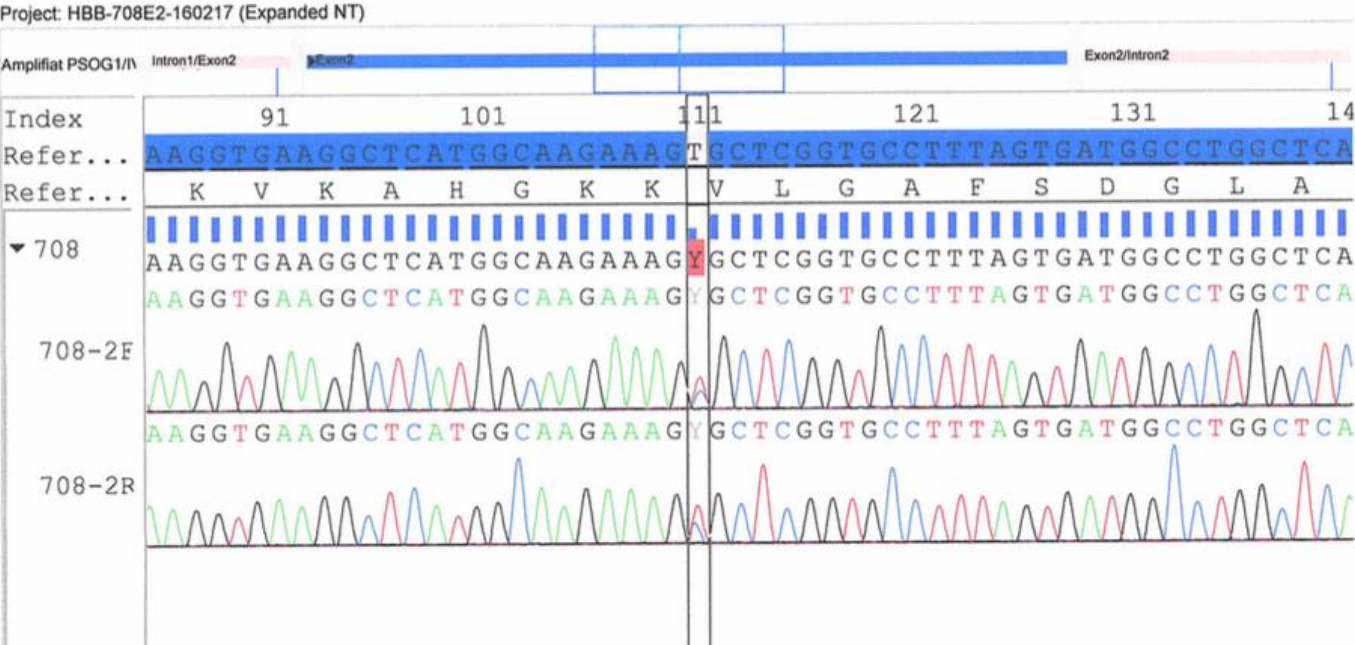


Figure 27 : Electrophorégramme hémoglobine Sydney β67 GTG>GCG

RECUEIL DE DONNEES DES
VARIANTS RARES AU
LABORATOIRE

I. Méthode

Nous avons recensé tous les variants d'hémoglobine hyperaffine qui ont été mis en évidence au laboratoire depuis 1993, celui-ci fait partie du Centre de Référence Syndromes Drépanocytaires Majeurs, Thalassémies et Autres Pathologies Rares du Globule Rouge et de l'Erythroïèse (Pr Christian Rose).

Nous avons relevé tous les variants du laboratoire grâce à des archives que nous conservons au laboratoire, nous avons ainsi pu retrouver les profils électrophorétiques et les prescripteurs. Ensuite, nous sommes allés consulter les dossiers dans les différents services dans lesquels sont suivis les patients (Hôpital Claude Huriez, Hôpital Saint-Vincent de Paul, Hôpital Jeanne de Flandres, Service d'hématologie du CH de Dunkerque, Service d'hématologie du CH de Lens, Service d'Hématologie du CHRU d'Amiens).

Afin de recueillir au mieux toutes les données de chaque patient, nous avons réalisé une fiche de recueil de données. Cette fiche reprend les antécédents familiaux du patient, l'histoire de sa maladie, date de diagnostic, autres cas familiaux, les signes cliniques, les complications potentielles, ces fiches sont disponibles en **Annexe 2**.

Ce qui nous intéresse particulièrement pour l'étude des hémoglobines hyperaffines est de relever si les patients ont fait des complications thrombotiques veineuses ou artérielles et s'ils présentent des signes d'hyperviscosité, on s'intéresse également à la prise en charge du patient. Ces variants d'hémoglobine ont toujours été décrits comme étant le plus souvent asymptomatiques, nous avons recherché si nos patients ont pu présenter des signes cliniques qui pourraient être en rapport avec ces hémoglobinopathies.

En ce qui concerne les hémoglobines instables, on s'intéresse également aux complications qu'ont pu présenter les patients, notamment liées à la surcharge martiale, complications lithiasiques, ou encore thrombotiques.

Cette fiche pourrait par la suite être utilisée par d'autres centres de référence et de compétence afin d'établir un plus grand recueil de données.

Les données clinico-biologiques que nous avons relevés pour tous les patients sont résumées dans le **tableau 7** (Hb hyperaffines) et **tableau 10** (Hb instables).

II. Résultats Hémoglobines hyperaffines

1. Circonstances de diagnostic

Comme nous l'avons évoqué dans la physiopathologie des hémoglobines hyperaffines, ces variants d'hémoglobine vont être à l'origine d'une polyglobulie (PG).

La PG se définit par une masse sanguine > 25% de la masse théorique selon le poids, la taille et le sexe. Cette masse sanguine permet d'éliminer les fausses PG (hémococoncentration, trait thalassémique) (76) . La PG entraîne un taux d'Hb >18 g/dL chez l'homme, >16g/dL chez la femme, >13g/dL chez l'enfant (6mois-6ans), > 15g/dL chez l'enfant de 12 à 15ans, un hématocrite > 51% chez l'homme et >47% chez la femme.

Le diagnostic est évoqué le plus souvent sur un hémogramme réalisé à titre systématique ou devant des signes fonctionnels d'hyperviscosité, devant des complications cardiovasculaires ou encore devant une PG isolée chez un patient jeune.

Les causes de PG sont multiples, elles peuvent être classées en PG acquises ou congénitales. (Tableau 5)

PG Acquises	PG congénitales
<ul style="list-style-type: none">• Maladie de Vaquez• Hypoxémie chronique : maladie pulmonaire chronique, vie en altitude, cardiopathies acquises• Sécrétion inappropriée d'EPO :<ul style="list-style-type: none">▪ <i>Affections rénales</i> : kystes, tumeurs, transplantation rénale▪ <i>Affections hépatiques</i> : carcinome hépatocellulaire, tumeurs▪ <i>Tumeurs</i> : hémangioblastome du cervelet, fibrome utérin...• Toxiques : Intoxication chronique au CO (gros fumeurs), prise d'androgènes ou d'EPO	<ul style="list-style-type: none">• Variants d'hémoglobine hyperaffine• Déficit en 2-3 DPG diphosphoglycérate mutase (déficit en 2-3 DPG)• Mutations touchant le récepteur à l'EPO• Mutations du gène HIF2α et/ou des genes impliqués dans la voie de l'hypoxie• Cardiopathies congénitales hypoxémiantes

Tableau 5 : Liste non exhaustive des PG acquises et congénitales

2. Démarche diagnostique d'une hémoglobine hyperaffine

La première étape dans la démarche diagnostique d'une polyglobulie est d'effectuer une mesure de la masse sanguine pour confirmer une polyglobulie, puis dans un second temps il faut éliminer les causes de polyglobulies acquises, le dosage de l'EPO est primordial dans cette orientation diagnostique ainsi que la recherche des mutations en faveur des syndromes myéloprolifératifs, avant de suspecter une hémoglobine hyperaffine. Pour identifier le variant d'hémoglobine hyperaffine, nous réalisons dans un premier temps en parallèle la RAHB et la mesure de la PO₂50, puis dans un second temps un séquençage du gène HBB lorsque cela s'avère nécessaire (diminution PO₂50, mise en évidence d'un variant, la demande de biologie moléculaire peut se faire au cas par cas selon les données clinico-biologiques du patient). Nous proposons l'algorithme suivant de diagnostic des hémoglobines hyperaffines (Fig.28).

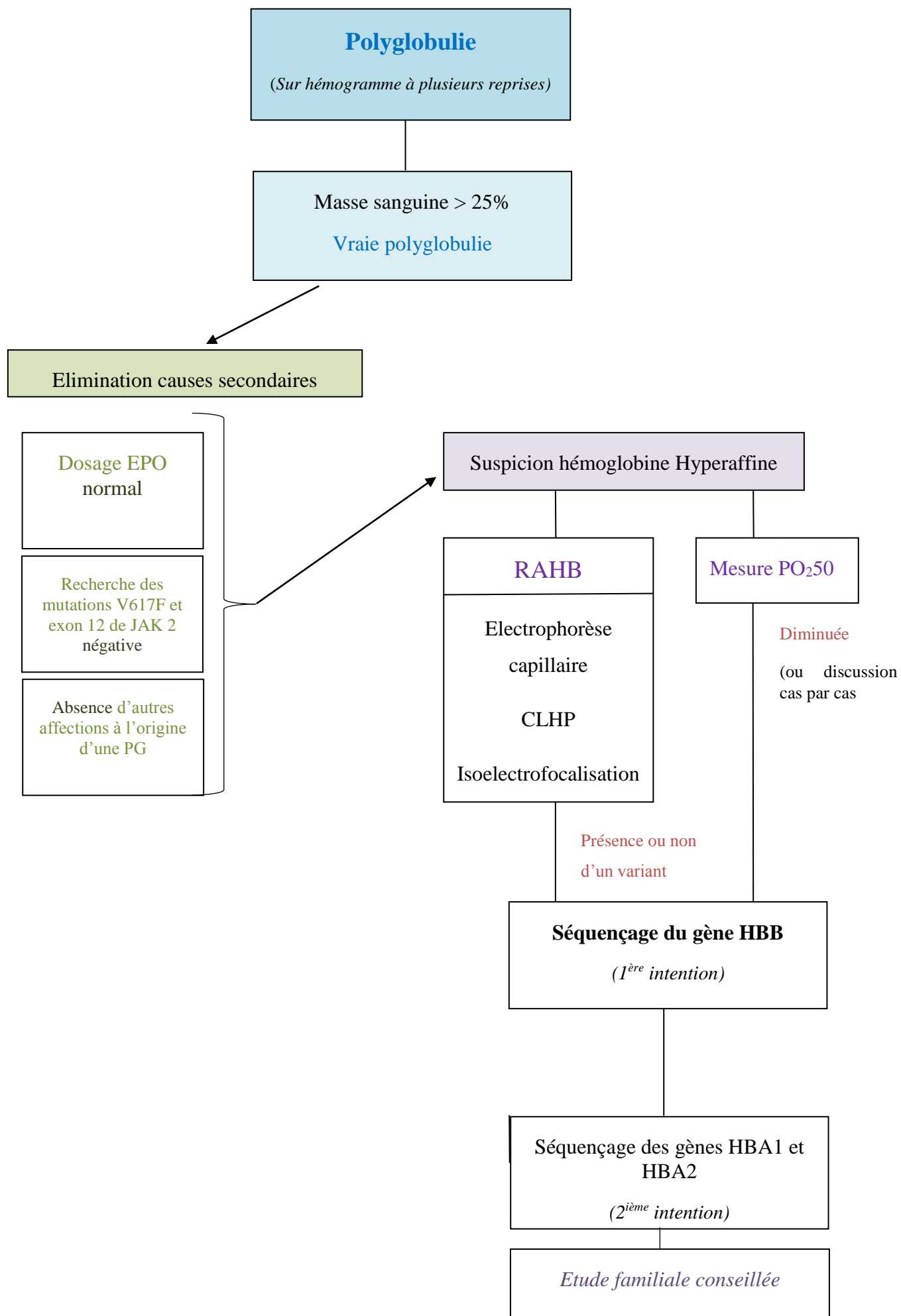


Figure 28 : Proposition d'arbre décisionnel en cas de suspicion d'hémoglobine hyperaffine au CHRU de Lille 81

3. Variants mis en évidence au CHRU de Lille

Nous avons relevé l'identification de 6 variants d'hémoglobine hyperaffine qui concernent 12 patients âgés de 22 à 88 ans.

Parmi ces 6 variants, 5 sont liés à une mutation sur le gène β , un est lié à une mutation sur le gène α_2 (**Tableau 6**).

Variant	Mutation
Hb Olympia	Beta 20 Val>Met
Hb Tak	Beta 147 (+AC)
Hb San Diego	Beta 109 Val>Met
Hb Pierre-Bénite	Beta 90 Glu>Asp
Hb Malmö	Beta 97 His>Gln
Hb Columbia-Missouri	Alpha2 88 Ala>Val

Tableau 6 : Liste des variants hyperaffins mis en évidence au laboratoire

- **Hémoglobine Pierre-Bénite : Beta 90 Glu>Asp**

Deux patients de l'étude sont porteurs de ce variant. Un homme âgé de 65 ans (**patient n°1**) et sa sœur âgée de 57 ans (**patient n°2**), tous deux suivis au Centre Hospitalier de Dunkerque.

Biologie :

Ce variant en $\beta 90$ ne modifie pas la charge ni la polarité de la molécule, il est donc difficile de le mettre en évidence par les techniques électrophorétiques dont nous disposons au laboratoire. Devant la polyglobulie, l'élimination des causes de polyglobulies acquises, et la diminution de la $P_{O_2 50}$, le diagnostic a été posé par séquençage du gène β . Le résidu en $\beta 90$ n'est pas impliqué dans une zone de contact, il se trouve proche de l'histidine proximale $\beta 92$ et entre deux résidus hydrophobes. Il est assez étrange que cette mutation soit à l'origine d'une augmentation de l'affinité alors que deux autres variants liés à une mutation en $\beta 90$ (Hémoglobine Roseau-Pointe-à-Pitre ($\beta 90$ Glu>Asp) et Agenogi ($\beta 90$ Glu<Lys) sont à l'origine d'une diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour l' O_2 (77).

Il est intéressant de noter la difficulté et l'errance diagnostique de ces pathologies puisqu'en effet pour ces deux patients, la polyglobulie est mise en évidence depuis 2012 avec une mutation JAK2 V617F négative et des taux d'EPO normaux à cette époque. Le diagnostic d'hémoglobine hyperaffine n'est posé qu'en 2016.

Clinique :

Le **patient n°1** présente des facteurs de risques cardio-vasculaires, une dyslipidémie avec surcharge pondérale (IMC à 31), une hypertension artérielle. Il a présenté des complications thrombotiques : Infarctus du myocarde en 2002 (date à laquelle il fumait encore 35 paquets/année), AVC en 2006. Il ne subit pas de saignées systématiques mais seulement lorsque l'Hb >18g/dL ou Ht >54% (aucune depuis le diagnostic). Il reçoit du Kardegic® en prévention. Sa sœur, la **patiente n°2**, ne présente aucun facteur de risque cardio-vasculaire, aucune complication thrombotique, cliniquement elle présente une érythrose faciale. La prise en charge consiste simplement en un suivi régulier de la NF (tous les 6 mois) devant la PG modérée de cette patiente (chiffres de base : Hb :16 /dL, Ht :50%) et l'absence d'autres facteurs de risque CV. De manière assez étonnante, nous avons d'abord mis en évidence l'hémoglobine hyperaffine chez la **patiente n°2**, une étude de l'hémoglobine était demandée devant une polyglobulie sur un hémogramme systématique.

- **Hémoglobine San Diego β 109 Val>Met**

Le **patient n°3** est porteur hétérozygote de ce variant, il s'agit d'un homme âgé de 60 ans qui est suivi au CH de Lens. Ce monsieur est suivi depuis 15 ans pour une polyglobulie mise sur le compte d'une érythrose pure d'allure familiale. Le diagnostic d'hémoglobine hyperaffine est posé en juillet 2016. Sa sœur suivie au CHU d'Amiens (données clinico-biologiques non récupérées) semble être également porteuse de ce variant de transmission autosomique dominante. Cette mutation touche différentes ethnies, elle a été décrite pour la première fois aux Etats-Unis (San Diego) chez 6 membres d'une famille philippine (78). Elle a également déjà été décrite en France (79).

Clinique :

Ce patient est suivi depuis 2005 pour sa polyglobulie mise sur le compte d'une érythrose pure d'allure familiale traitée par saignées mensuelles. Dans ses antécédents on note une insuffisance veineuse déjà compliquée d'une paraplégie. Il présente une hypertension artérielle qui évolue depuis 3 ans traitée par Coversyl®, il était fumeur sévère (tabac sevré il y a 20 ans). La prise en charge repose sur une prévention des thromboses par du Kardegic® et des saignées si l'hématocrite > 55% ou si le patient présente des signes d'hyperviscosité. Depuis le diagnostic, le patient a été saigné à plusieurs reprises : il a présenté des céphalées en casque pendant 15 jours contemporaines d'un hématocrite à 60,8% (saignée 400 cc) en janvier 2017, puis une nouvelle saignée a été entreprise en juin 2017 (400 cc) devant un Hématocrite à 60,4%.

Le patient n°4 est également porteur hétérozygote d'une hémoglobine San-Diego, il n'y a aucun lien de parenté entre ces deux patients. Il s'agit d'un homme âgé de 46 ans diagnostiqué en 2015 à l'âge de 44 ans. Ce patient est suivi au CHU d'Amiens. Il n'a pas d'antécédents thrombotiques veineux ni artériels et ne présente pas de signes d'hyperviscosité en dehors d'une légère paresthésie des membres inférieurs (conflit disco-radulaire connu). Le patient possède cependant des facteurs de risque cardio-vasculaires associés avec notamment une obésité (IMC chiffré à 40) accompagnée d'une sédentarité importante (il exerce le métier de chauffeur routier), une hypercholestérolémie très modérée ainsi qu'un tabagisme très modéré. Au niveau de la prise en charge, elle repose également sur le recours aux saignées en cas de manifestations d'hyperviscosité et dès que l'hématocrite est supérieur à 54%, traitement antiagrégant plaquettaire (Aspirine 100 mg/jour).

Biologie :

En RAHB, nous mettons en évidence une HbA2 faible, le variant migre au niveau de l'HbA0 en électrophorèse capillaire (Capillarys Sebia) et en CLHP (Tosoh G8). C'est encore une fois, la diminution de la PO₂50 (20 mmHg) qui conduit à séquencer le gène β qui a permis de poser le diagnostic (Fig.29).

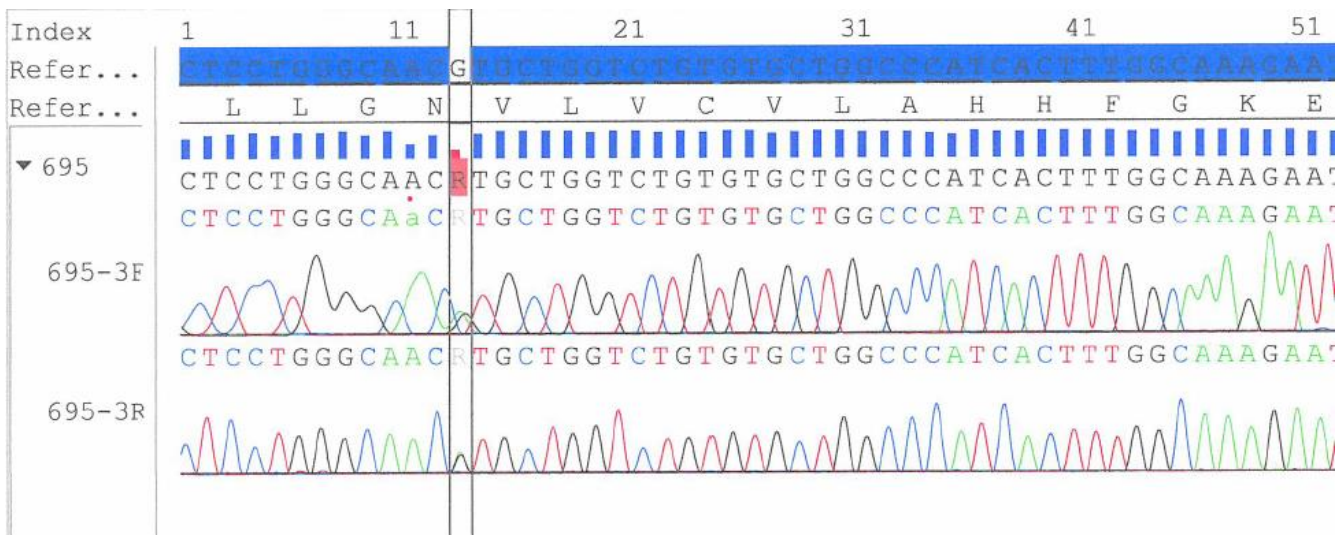


Figure 29 : Mise en évidence de la mutation HBB : 328G>A par séquençage de type Sanger

- **Hémoglobine Tak β147 (+AC)**

Le patient n°5 est un jeune homme âgé de 22 ans au moment du diagnostic. Il s'agit d'un patient d'origine cambodgienne adopté dans l'enfance dont on ne peut pas retracer l'histoire familiale. Ce patient est atteint d'une hépatite B suivi au CHRU de Lille, depuis 2014 sont observées à l'hémogramme des valeurs élevées d'hémoglobine et d'hématocrite. Un bilan de polyglobulie est entrepris et devant la diminution de la PO₂50 une hémoglobine hyperaffine est suspectée.

Biologie :

En électrophorèse capillaire nous mettons en évidence un variant d'hémoglobine exprimé à 35% élué dans la zone de l'Hb F. En CLHP, nous obtenons un variant à 34% qui migre au niveau de l'hémoglobine S. En isoélectrofocalisation, le variant migre également comme l'hémoglobine fœtale (Fig.30). Le test de solubilité réalisé lors de la suspicion d'une hémoglobine S est négatif. Ces profils soulignent bien le fait qu'il faut obligatoirement réaliser plusieurs techniques avant de conclure.

La réalisation d'un séquençage du gène β globine est indispensable afin d'identifier le variant. Le patient s'avère porteur hétérozygote d'un mutant du 3^{ème} exon du gène β-globine : bêta 147 (+AC) ; avec pour conséquence un allongement de la séquence C-terminale : (147) Thr-Lys-Leu-Ala-Phe-Leu-Leu-Ser-Asn-Phe-(157)Tyr-COOH (Hb Tak) (HBB :c441_442insAC).

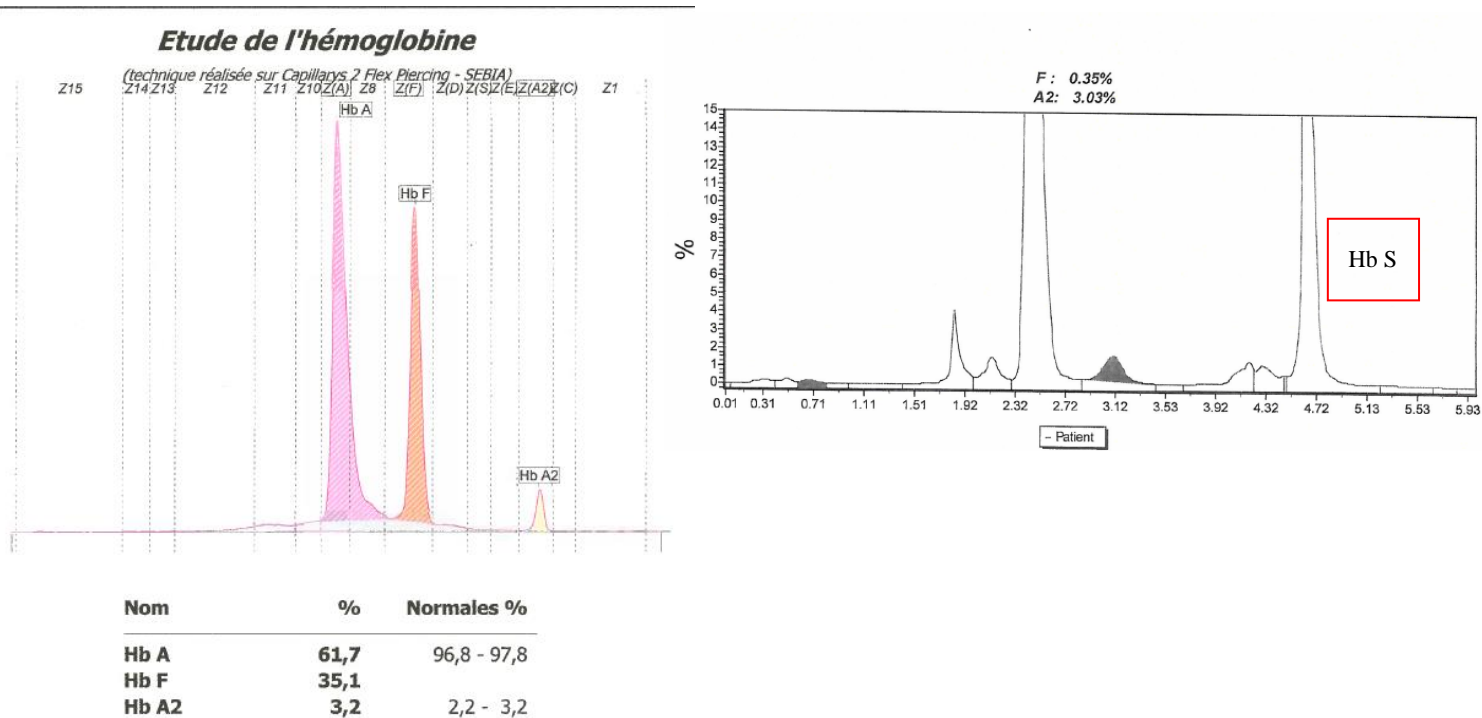


Figure 30 : Profils du patient n°5 en électrophorèse capillaire et CLHP

Clinique :

Il s'agit d'un variant décrit dans plusieurs familles Thaï. Une forme homozygote a été décrite très polyglobulique (80).

Le patient est asymptomatique, il a été saigné de manière systématique avant le diagnostic (3 saignées de 400cc en août 2016). La prise en charge repose sur des saignées dès lors que l'Ht >55%, le Kardegic® en prévention du risque thrombotique de cette hémoglobinopathie est proscrit devant le caractère discrètement instable de ce variant. Il s'agit d'un patient jeune qui n'a pas encore présenté de complications pouvant être liées à l'hémoglobine Tak.

- **Hémoglobine Columbia-Missouri α_2 88 Ala>Val**

Le **patients n°6** ainsi que ses deux enfants **patients n°7** et **patient n°8** sont porteurs de ce variant. Il a été décrit en 1991 pour la première fois. La position de la substitution sur la chaîne α se situe au niveau de l'hélice F (F9), le résidu en F9 va établir des liaisons hydrogènes avec l'histidine proximale en F8 de façon à stabiliser la forme T de l'hémoglobine de faible affinité pour l'oxygène. La valine de l'hémoglobine Columbia-Missouri possède une charge et une hydrophobicité équivalentes à celles de l'Alanine mais un encombrement

stérique légèrement plus important ce qui a pour conséquence de déplacer légèrement l’Histidine proximale et stabilise la forme R (81).

Pour cette hémoglobine, le variant a dans un premier temps été mis en évidence chez le **patient n°8** âgé de 25 ans (20 ans au diagnostic) suite à des NF réalisées dans le cadre du suivi de sa vascularite (maladie de Behçet dont est également atteinte sa sœur) en médecine interne. Un hémocrite élevé à 54% et la survenue d’acouphènes intermittents conduisent à une consultation en Hématologie où un bilan de polyglobulie est entrepris et une saignée de 300 cc réalisée en 2009. Deux ans plus tard, l’étiologie de la polyglobulie n’est toujours pas élucidée, le patient se plaint de céphalées régulières, de nouvelles saignées sont réalisées. L’investigation continue et l’on met en évidence une diminution de la PO₂50, une RAHB est réalisée.

Biologie :

Malheureusement, l’hémoglobine Columbia Missouri n’est pas séparée de l’HbA0 par les techniques d’électrophorèse classiques réalisée au laboratoire, nous mettons tout de même en évidence un dédoublement de l’Hémoglobine A0 en isoelectrofocalisation (Fig.31) qui conduit à la réalisation du séquençage du gène β dans un premier temps dans notre laboratoire. Puis la mutation du gène α_2 est enfin mise en évidence au laboratoire de l’hôpital Henri-Mondor qui réalise le séquençage des gènes α .

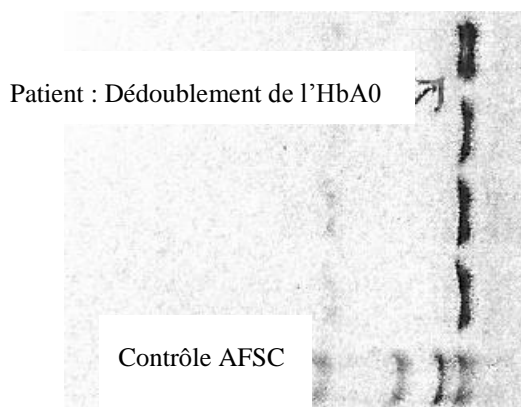


Figure 31 : Isoelectrofocalisation patient 8

Patient n°8 :

Cliniquement, le **patient n°8** a présenté de signes d'hyperviscosité notamment des acouphènes intermittents et des céphalées régulières qui ont conduit au diagnostic. Il n'a pas présenté de complications thrombotiques pour le moment malgré un séjour en altitude au Pérou de 8 mois qui avait nécessité un traitement par Kardegic® 160 mg (après test d'instabilité négatif éliminant une instabilité de l'hémoglobine) et l'injection d'héparine de bas poids moléculaire pour le vol en avion. Il est à noter que ce patient a escaladé un mont à 6000m d'altitude sans présenter la moindre complication. La prise en charge repose sur un suivi régulier et le recours aux saignées si Ht > 54%.

Patient n°7 :

La découverte de l'hémoglobine hyperaffine du patient n°8 a conduit à faire une RAHB chez sa sœur, elle aussi porteuse du variant. Il s'agit d'une patiente âgée de 28 ans (24 ans au diagnostic). Elle est aussi atteinte comme son frère d'une vascularite systémique qui peut être un facteur supplémentaire des complications liées à l'érythrocytose. Elle n'a jamais présenté de complications thrombotiques. Enceinte, (accouchement en septembre 2017) elle a bénéficié d'une prise en charge par Kardegic®.

Patient n°6 :

Contrairement à sa fille, le patient n°6 âgé de 58 ans n'a pas été dépisté suite à la découverte de l'hémoglobine hyperaffine chez le patient n° 8 (son fils). Le diagnostic s'est fait pour lui à la suite d'une complication thrombotique qui pourrait être liée au variant. Ce patient a en effet présenté de façon brutale et isolée (sans céphalées) un scotome central droit expliqué par une occlusion de la branche temporale inférieure de la veine centrale de la rétine avec des hémorragies en flammèches étendues à l'origine d'une perte importante de l'acuité visuelle.

Outre son hémoglobine hyperaffine, ce patient présente comme facteurs de risque cardio-vasculaires un tabagisme important (1 paquet/jour) et une hypertension artérielle traitée. Sa prise en charge repose sur un antiagrégant plaquettaire à vie et le recours aux saignées si Ht > 54% (aucune saignée réalisée jusqu'à présent).

- **Hémoglobine Malmö β 97 His > Gln**

Il s'agit d'un variant qui a été décrit chez plusieurs familles suédoises et en Allemagne ainsi qu'en France notamment à Lyon (82)(83). Deux mutations différentes ont été mises en

évidence pour ces variants CAC → CAG et CAC → CAA toutes deux à l'origine du remplacement d'une histidine par la glutamine.

Biologie :

Nous mettons en évidence un variant uniquement en CLHP (variant d'hémoglobine X exprimé à environ 46%) puis le séquençage du gène β nous permet de conclure à un variant Malmö.

Clinique :

Les deux patients porteurs de ce variant sont des frères jumeaux. Le diagnostic a été entrepris suite à la découverte fortuite d'une polyglobulie importante chez l'un d'eux lors d'un bilan réalisé à la médecine du travail.

Les deux patients ne présentent pas de facteurs de risque cardiovasculaires associés et n'ont pas présenté de complications thrombotiques ni de signes cliniques d'hyperviscosité. Toutefois, devant le taux d'hématocrite particulièrement élevé, la prise en charge thérapeutique est constituée d'un traitement par Kardegic® à vie ainsi que le recours aux saignées dès lors que l'Ht est > à 55% (environ 3 à 4 saignées par an).

- **Hémoglobine Olympia β 20 Val > Met**

L'hémoglobine hyperaffine Olympia est l'une des plus fréquentes en France (84), elle a été décrite associée à des β -thalassémies dans des familles d'origine méditerranéenne.

Clinique :

Le **patient n°11** âgé de 73 ans au diagnostic, aujourd'hui décédé est d'origine algérienne. Il présente un trait β -thalassémique mis en évidence en 1969. Associée à cette hémoglobinopathie, une polyglobulie est d'emblée présente, d'abord mise sur le compte de la thalassémie puis en 1972 on évoque le diagnostic de maladie de Vaquez éliminé par la suite puisque le patient ne présentera pas d'aggravation de la polyglobulie alors qu'il n'a pas subi de saignées ni reçu de traitement médicamenteux.

En 1989 alors que le patient n'est plus suivi depuis plusieurs années se pose le problème d'un syndrome vertigineux et des bouffées vasomotrices. Un dosage de la PO₂50 est réalisé ainsi qu'une RAHB, il faudra attendre 2002 et le diagnostic moléculaire pour identifier une hémoglobine Olympia.

Au niveau cardiovasculaire, le patient est victime d'un AVC en 2002 puis il présente une décompensation cardiaque gauche en 2003 et un œdème pulmonaire en 2005 et 2007. Nous ne connaissons pas les facteurs de risque CV associés que présentait le patient.

La prise en charge thérapeutique reposait sur des saignées régulières (avant que le diagnostic ne soit posé notamment) dès que l'Ht >53 % dans un premier temps puis Ht > 50% dans un second temps. Un traitement médicamenteux par Kardegic® est instauré après la survenue de l'AVC en 2002.

Biologie :

L'hémoglobine Olympia est un variant neutre, non mise en évidence par les techniques d'électrophorèse utilisée et l'isoelectrofocalisation (85). Cependant devant la diminution de la PO₂50 et l'élimination des causes de polyglobulies acquises nous avons entrepris de réaliser un séquençage du gène β.

Le **patient 12** est également porteur d'une hémoglobine Olympia, le diagnostic a été posé très récemment en janvier 2018, il s'agit d'un patient âgé de 70 ans suivi au CH de Lens depuis février 2015 pour une érythrocytose pure sans argument pour un syndrome myeloprolifératif. C'est la deuxième hémoglobine hyperaffine diagnostiquée pour ce Centre Hospitalier en deux ans (patient n°3), ce qui témoigne encore du sous-diagnostic de ces variants jusqu'à ces dernières années. Ce patient était saigné environ une fois par an pour hémochromatose, il ne présente pas de signes d'hyperviscosité.

4. Conclusion variants d'hémoglobine hyperaffine

Au niveau biologie, nous retenons le fait que la plupart des variants ne sont pas mis en évidence par nos techniques d'électrophorèse et d'isoélectrofocalisation, la substitution par un acide aminé de même charge ne permet pas la séparation. En RAHB nous avons pu identifier trois variants l'Hb Tak qui migre au niveau de l'hémoglobine F en électrophorèse capillaire et au niveau de l'hémoglobine S en CLHP, cela illustre bien le fait qu'il est indispensable de réaliser plusieurs techniques avant de conclure. L'isoélectrofocalisation a permis de mettre en évidence l'existence d'un variant pour l'hémoglobine Columbia-Missouri. En effet, cette technique a montré un dédoublement de l'hémoglobine A0. La CLHP était informative pour la mise en évidence du variant Malmö. Ces techniques ne permettent pas de poser le diagnostic, en effet, elles permettent de mettre en évidence l'existence d'un variant mais seul

le séquençage du gène va permettre l'identification de la mutation et de poser le diagnostic définitif.

L'étude de la PO₂50, lorsque les conditions pré-analytiques sont respectées, pour nos variants est bénéfique puisqu'elle est diminuée pour 10 patients sur 12 (pour un patient porteur d'une hémoglobine Malmö elle est normale, elle n'était pas réalisée pour une Hb Olympia). L'algorithme décisionnel que nous avons réalisé pour la recherche des hémoglobines hyperaffines au CHRU de Lille est donc bien justifié. A savoir, le séquençage des gènes de l'hémoglobine ne sera réalisé que si le patient présente une diminution de la PO₂50.

La deuxième chose à noter est qu'il existe une errance diagnostique importante. En effet, le temps entre la découverte de la polyglobulie et le diagnostic final peut-être plus ou moins long. Cependant, on remarque que cette durée diminue pour les variants qui ont été mis en évidence chez des patients récemment (2016-2017), alors qu'il était très long pour le patient n°11 par exemple. Cela montre une connaissance nouvelle de ces hémoglobinopathies qui vont commencer à rentrer dans le cheminement diagnostique des polyglobulies persistantes. Pour tous les patients, une élimination préalable des causes de polyglobulies acquises notamment la recherche des mutations JAK2 a été effectuée auparavant. L'âge moyen au diagnostic est de 44 ans pour notre étude.

Les circonstances de diagnostic sont le plus souvent la découverte fortuite suite à la mise en évidence d'une polyglobulie sur un bilan systématique, un dépistage après la découverte chez un parent (c'est le cas pour 3 patients). Pour un seul patient la recherche a été effectuée après la survenue d'une complication thrombotique d'emblée.

Sur nos 12 patients, 4 ont fait des complications thrombotiques que l'on pourrait relier à leur hémoglobinopathie entre autres causes. Ces complications surviennent chez des patients de plus de 50 ans qui ont été diagnostiqués à un âge déjà avancé et qui présentaient d'autres facteurs de risque cardiovasculaire notamment un tabagisme qui aggrave l'hypoxie et de l'hypertension artérielle. Chez les patients jeunes (moins de 40 ans) on ne note pas de complications, seulement un patient âgé de 29 ans a présenté des signes cliniques d'hyperviscosité de type acouphènes, céphalées probablement liés à son hémoglobinopathie.

La prise en charge thérapeutique repose sur des saignées, le taux d'hématocrite cible est d'environ 55% pour éviter tout risque thrombotique et essayer de maintenir une délivrance de l'oxygène aux tissus la meilleure possible. Un taux d'hématocrite cible à 50% est trop bas car les saignées vont favoriser l'hypoxie. En cas d'absence de saignées il peut y avoir survenue de complications thrombotiques et à l'inverse en cas de saignées trop excessives il peut exister

une hypoxie tissulaire responsable de complications au long cours. En cas de survenue de complications thrombotiques un traitement antiagrégant plaquettaire est instauré à vie, ou en cas de situations à risque (séjour en altitude pour un patient, grossesse pour une autre). Un suivi cardiologique avec une exploration de la fonction cardiaque avec consommation d'oxygène au repos et à l'effort doit être effectué, en effet des complications cardiaques en rapport avec le cœur anoxique peuvent survenir.

On peut se poser la question d'un rôle du sexe dans la présentation clinique de ces maladies. En effet, dans notre étude seulement deux femmes (patiente n°2 et patiente n°7) pour 10 hommes sont porteuses d'une hémoglobine hyperaffine. La patiente n°2 n'a pas présenté de signes cliniques ni de complications thrombotiques mais il est difficile d'interpréter la différence d'expression de l'hémoglobinopathie entre elle et son frère (patient n°1) puisque ce dernier a présenté d'autres facteurs de risques cardio-vasculaires. En revanche pour la patiente n°7 chez qui nous n'avons relevé aucun signe clinique on peut se poser la question d'une différence d'expression clinique par rapport à son frère, qui ne présente pas plus de facteurs de risques cardiovasculaires associés, dont les signes d'hyperviscosité ont conduit à rechercher l'étiologie de sa polyglobulie.

Enfin, on peut également illustrer que la polyglobulie et ses répercussions cliniques semblent s'accroître avec l'âge. En effet, le patient n°6, père des patients n°7 et n°8 présente un taux d'hémoglobine et d'hématocrite beaucoup plus élevé que ses deux enfants au diagnostic et a déjà présenté des complications thrombotiques.

En ce qui concerne la fréquence de diagnostic de ces hémoglobinopathies dans notre laboratoire, nous confirmons qu'il s'agit de variants rares. En 2016, 1630 RAHB ont été effectuées, 4 hémoglobines hyperaffines ont été identifiées. En 2017, 1 hémoglobine hyperaffine était identifiée, de même pour le 1^{er} trimestre de 2018. Cependant, le nombre de diagnostic tend à augmenter ces dernières années afin de documenter les polyglobulies sans étiologie. En effet, 6 patients sur 12 ont été diagnostiqués en 2016/2017 et au premier trimestre 2018. Ce qui montre que la demande de recherche d'hémoglobine hyperaffine commence à entrer dans l'arbre décisionnel diagnostique de la polyglobulie. Nous pensons qu'il existait un sous-diagnostic important de ces hémoglobinopathies. Deux patients (n°3 et n°12) ont été diagnostiqués dans le même Centre Hospitalier ces deux dernières années, ils étaient suivis depuis respectivement 15 ans et 3 ans pour des polyglobulies sans étiologie, ce qui nous amène à penser que dans les prochaines années, le nombre de demande de recherche de variants hyperaffins pourrait augmenter.

Patient	Age	Age au diagnostic	Date de diagnostic	Type d'Hb hyperaffine	Autres cas dans la famille	Taux d'Hb(g/dL) et Ht (%) au diagnostic PO250 (mmHg)	Elimination des autres causes de PG			Facteurs de risque CV	Complications thrombotiques,	Clinique	Prise en Charge
							V61 7F Nég	Exon 12 Nég	EPO N				
1 (M)	65 ans	64 ans	Août 2016	Pierre-bénite	Sœur (patient n°2)	Hb :17,3 Ht : 52,5 PO250 : 22,7	2012		2012	-Tabagisme sévère (2002 ?) -HTA -Dyslipidémie	-IDM en 2002 -AVC 2006 -Cardiopathie ischémique	Erythrose	-Saignées non systématiques (Hb> 18, Ht> 54) -Kardegic®
2 (F)	57 ans	56 ans	Avril 2016	Pierre-Bénite	Frère (patient n°1)	Hb : 16,6 Ht :50 PO250 :21,9	2012	2016	2012			Erythrose faciale	(Caractère modéré de la PG)
3 (M)	60 ans	59 ans	Juillet 2016	San-Diego	Sœur suivie à Amiens	Hb : 18,5 Ht : 54 PO250 :20	2007		2007	-HTA traitée par coversyl®	-Paraphlébite Membres inférieurs	Signes d'hyperviscosité fréquents : céphalées, paresthésies des 2 mains (2014), érythrocyanose	-Saignées : motivées par les signes d'hyperviscosité, céphalées++, Ht>55% -Kardegic®
4 (M)	46 ans	44 ans	Octobre 2015	San-Diego	non	Hb : 19 Ht :56 PO250 diminuée	Mars 2014			-Surcharge pondérale Hypercholestérolémie très modérée -Tabagisme très modéré -Sédentarité ++			-Saignées si signes d'hyperviscosité et si Ht >54% - Aspegic 100mg
5 (M)	23 ans	22 ans	Août 2016	Tak	Adoption dans l'enfance	Hb : 18,3 Ht : 52,4 PO250 : 22,27	2016	2016	2016				-3 saignées de 400cc réalisées en août 2016 -Seulement si Ht>55% - Pas de Kardegic (caractère discrètement instable du variant)
6(M)	59 ans	59 ans	Mars 2017	Columbia-Missouri	Fille (patient n°7 et fils patient n°8)	Hb : 19 Ht : 56,9 PO250 : 20	2017	2017	2017	-Tabagisme important (1 paquet/jour) -HTA traitée	-occlusion de la veine centrale de la rétine avec hémorragies en flammèches : diminution de l'acuité visuelle		- Saignées dès que Ht >54 % -Aspirine

Patient	Age	Age au diagnostic	Date de diagnostic	Type d'Hb hyperaffine	Autres cas dans la famille	Taux d'Hb(g/dL) et Ht (%) au diagnostic PO250 (mmHg)	Elimination des autres causes de PG			Facteurs de risque CV	Complications thrombotiques, signes d'hyperviscosité	Clinique	Prise en Charge
							V61 7F Nég	Exon 12 Nég	EPO N				
7 (F)	29 ans	24 ans	Août 2012	Columbia-Missouri	Père (patient n° 6) et frère (patient n°8)	Hb : 16 Ht : 46,4% PO250 diminuée				-Vascularite traitée par Humira (Maladie de Behçet)		-aspirine pendant la grossesse	
8 (M)	25 ans	20 ans	Janvier 2012	Columbia-Missouri	Père (patient n° 6) et sœur (patient n°7)	Hb : 17 Ht : 49 PO250 : 19,87	2009 et 2011	2009 et 2011	2009	-Vascularite traitée par Humira (Maladie de Behçet)	Acouphènes intermittents en 2009 et céphalées régulières	-Saignées dès que Ht > 54%	
9 (M)	31 ans	19 ans	Novembre 2005	Malmö	Frère (patient n°9)	Hb : 19,3 Ht : 59,6 PO250 diminuée	2005	2005	2005			-Kardegic® à vie -Saignées dès que Ht > 55% (de l'ordre de 3 à 4 par an)	
10 (M)	31 ans	19 ans	Novembre 2005	Malmö	Frère (patient n°10)	Hb : 18 Ht : 54,6 PO250 : 27 (normale)	2005	2005	2005			-Kardegic® à vie -Saignées dès que Ht > 55% (de l'ordre de 2 par an)	
11 (M)	décédé	73 ans	Juin 2002	Olympia	Non connu	Ht : 54					-AVC en 2002 -Décompensation cardiaque gauche en 2003	-Saignées Ht < 50% -Kardegic® suite à l'AVC	
12 (M)	70 ans	70 ans	Janvier 2018	Olympia	Non connu	Hb : 19,4 Ht : 56,8 PO250 : 20,25	2015	2015				-Kardegic® -Saignées 1 fois par an avant le diagnostic, pour hémochromatose	

Tableau 7 : Résumé du recueil de données des variants hyperaffins

III. Résultats hémoglobines instables

1. Anémie hémolytique

Comme nous l'avons vu dans notre partie « physiopathologie des hémoglobines instables », ces variants vont être responsables d'anémie hémolytique. La durée de vie du globule rouge mature est d'environ 120 jours, l'anémie hémolytique (AH) est définie par la diminution de durée de vie des hématies, elle peut-être intra-vasculaire ou intra-tissulaire (extra-vasculaire).

La plupart des anémies hémolytiques sont constitutionnelles et de cause corpusculaire, elles sont révélées dans l'enfance. Cependant, il n'est pas rare surtout si l'hémolyse est modérée, de les mettre en évidence chez des adultes. La reconnaissance du mécanisme hémolytique de l'anémie est facile mais l'identification de sa cause peut être difficile comme c'est le cas pour les hémoglobines instables. La mise en évidence de l'étiologie va nécessiter une démarche hiérarchisée. On distingue l'AH corpusculaire liée à une anomalie du globule rouge (membrane, hémoglobine, enzyme) et l'AH extra-corpusculaire secondaire à un facteur extrinsèque (Tableau 8).

La diminution de l'haptoglobine est le signe d'hémolyse le plus sensible, les autres marqueurs biologiques sont l'augmentation de la bilirubine non conjuguée, du taux de LDH. En cas d'AH intra-vasculaire une hémoglobinurie et une hémossidérinurie sont également présentes. Elles sont le plus souvent régénératives avec une réticulocytose $> 120 \text{ G /L}$ (86).

AH	Constitutionnelles	Acquises
Corpusculaire	<u>Membrane</u>	
	Sphérocytose Elliptocytose Stomatocytose	HPN Acanthocytose
	<u>Hémoglobine</u>	
	Drépanocytose Hb instables Thalassémies ...	
	<u>Enzyme</u>	
	Déficit en G6PD Déficit en PK	
Extra-corpusculaire		Immunologiques : allo-immunisation, auto-immunisation... Mécaniques : MAT Infectieuses : paludisme, sepsis sévère Toxiques : médicamenteuses

Tableau 8 : Etiologies des anémies hémolytiques

2. Variants instables mis en évidence au CHRU de Lille

Nous avons recensé au laboratoire 10 variants d'hémoglobine instable, qui concernent 21 patients de 11 familles différentes. 8 mutations sont retrouvées sur le gène β et 2 sur le gène α_2 . Les variants sont résumés dans le **tableau 9**. Nous avons réalisé une fiche de recueil de données (**annexe 2**) (de la même manière que celle des hémoglobines hyperaffines) qui reprend les données diagnostiques, biologiques et cliniques pour chaque patient. Les données récoltées sont résumées dans le **tableau 10**. Nous nous sommes intéressés particulièrement aux complications de surcharge martiale (qui peut être liée à un apport transfusionnel pour certains variants, à une érythropoïèse inefficace ou encore à une association des deux), aux complications lithiasiques liées à l'hémolyse chronique et aux complications thrombotiques dues à la conjugaison d'une anémie chronique associée à une thrombocytose post-splénectomie.

Variant	Mutation
Hb Santa-Ana	Beta 88 Leu>Pro
Hb Sydney	Beta 67 Val>Ala
Hb Terre Haute	Beta 106 Leu>Arg
Hb Saint-Etienne	Beta 92 His>Gln
Hb Perth	Beta 32 Leu>Pro
Hb Burke	Beta 107 Gly>Arg
Hb Evans	Alpha2 62 Val>Met
Hb Templeuve	Beta 139-140 Asn-Ala>Thr
Hb Hammersmith	Beta 42 Phe>Ser
Hb Bibba	Alpha2 136 leu>Pro

Tableau 9 : variants instables mis en évidence ou suivis au CHRU de Lille

- **Hémoglobine Santa-Ana: Beta 88 Val>Ala**

Ce variant de transmission autosomique dominante concerne 6 patients de la même famille de notre étude, se référer à l'arbre de la figure 32 (**patients A1 à A6**). Il est peu décrit dans la littérature, les cas rapportés sont anciens et les complications potentielles ainsi que les signes cliniques sont non décrits (87). Les circonstances de diagnostic pour les cas suivis au laboratoire sont des études familiales, les patients A1 et A2 sont connus depuis l'enfance pour des anémies hémolytiques.

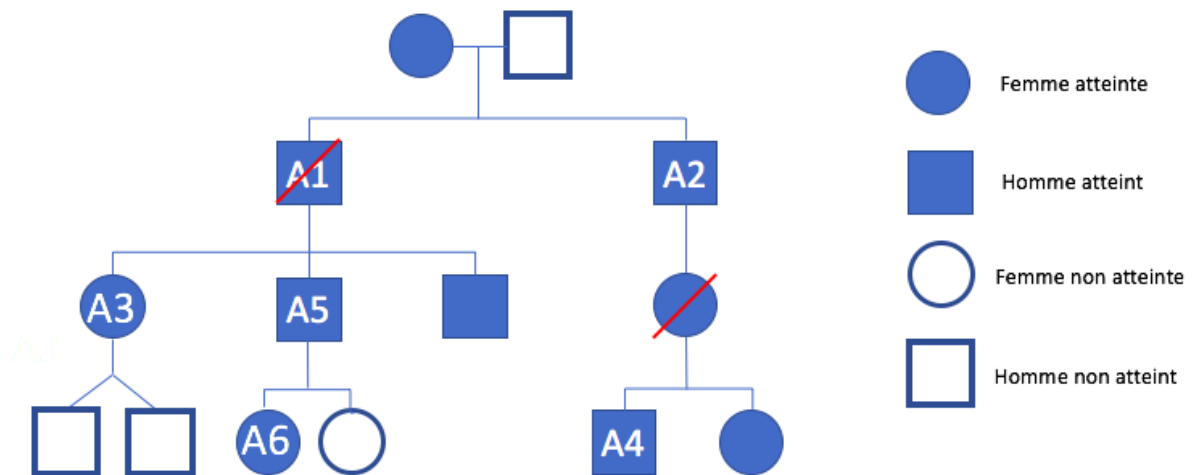


Figure 32 : Arbre génétique famille porteuse du variant Santa-Ana

Biologie :

Le taux d'hémoglobine de base de ces patients se situe aux alentours de 11 g/dL (chez les patients splénectomisés).

La RAHB était informative (Fig.33), en effet, le variant d'Hb Santa-Ana migre en électrophorèse capillaire sous la forme de 3 pics (X1, X2, X3) et sous la forme d'un pic majoritaire en CLHP. Les techniques électrophorétiques permettent donc d'évoquer la présence d'un variant, la migration sous forme de 3 pics évoque plutôt un variant instable, mais le diagnostic moléculaire reste évidemment indispensable pour identifier le variant.

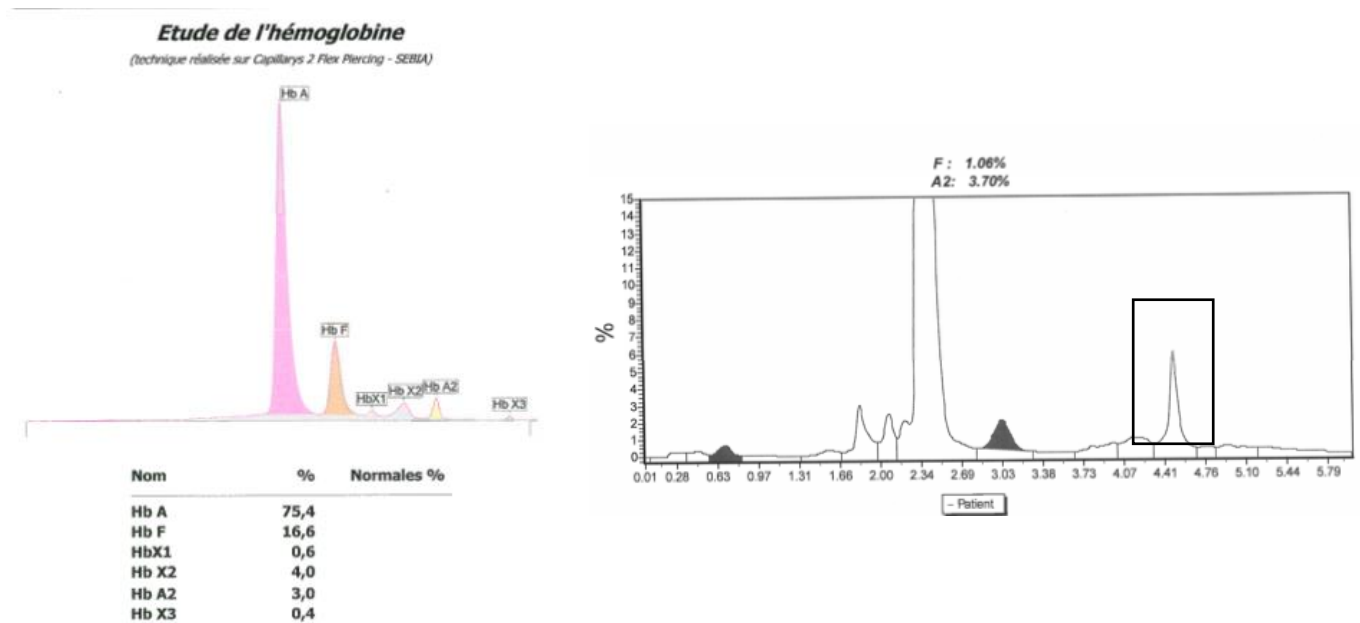


Figure 33 : Variant Santa-Ana en électrophorèse capillaire et CLHP

Clinique :

Dans cette famille, les patients A1, A3, A4 et A5 sont splénectomisés, le patient A2 a toujours refusé la splénectomie devant l'évolution chez son frère (patient A1) et sa fille.

Les complications relevées pour ce variant sont les suivantes :

- Complications lithiasiques : 2 patients ont été cholécystectomisés (A3 et A4) pour des complications lithiasiques. La patiente A3 âgée aujourd'hui de 42 ans présente une lithiase intra-hépatique très sévère.
- Complications thrombotiques : Elles sont assez conséquentes pour ce variant pour un petit nombre de patients connus. On relève des phlébites des membres inférieurs et supérieurs chez des patients jeunes (A3 et A5), le patient A1 a présenté un AVC en 1998 et est décédé des suites d'un infarctus mésentérique du grêle opéré à l'âge de 64 ans. On déplore également le décès de la fille du patient A2 (qui n'était pas suivie chez nous) d'une embolie pulmonaire à l'âge de 48 ans.
- Il ne s'agit pas d'un variant transfusion dépendant, mais deux patients ont déjà reçu des CGR (patients A2 et A4) suite à des syndromes infectieux. Le patient A4 a été transfusé suite

à des complications infectieuses graves récentes (novembre 2017), ayant provoqué une hémolyse aigüe importante.

- **Hémoglobine Sydney: Beta 67 Val>Ala**

Il s'agit d'un variant d'hémoglobine instable qui a été peu décrit également jusqu'à présent, on ne connaît ni les signes cliniques, ni les complications que peuvent présenter les patients (88). Dans notre série rétrospective deux familles différentes sont touchées par ce variant. **Les patients B1 et B2** (deux cousins), **le patient I1 et sa fille (I2)**, ses deux autres enfants sont également porteurs du variant. Le diagnostic s'est fait chez le patient B1 devant des épisodes d'asthénie, de douleurs abdominales, urines foncées (sa mère est également atteinte mais non suivie), le diagnostic a conduit à rechercher également le variant chez son cousin (patient B2). Les circonstances de diagnostic étaient différentes dans l'autre famille. En effet, le diagnostic a été posé chez la patiente I1 qui lors d'une appendicectomie a présenté une saturation basse à l'oxymètre de pouls lors de la surveillance de l'anesthésie. L'étude familiale montrait alors la présence du variant chez son père, son frère et sa sœur.

Biologie :

Le taux d'hémoglobine de base de ce variant est plus élevé, proche de la normale avec une Hb à environ 12 g/dL.

La RAHB est informative pour cette hémoglobine (Fig.34) le variant est caractérisé à J1 par CLHP sous la forme d'un pic X à 41%, et par électrophorèse capillaire à J5 et J8 sous la forme de deux pics X1 et X2. Il est intéressant lorsque l'on suspecte une hémoglobine instable de répéter la RAHB (en particulier l'électrophorèse capillaire et la CLHP) à différents jours (J2, J5 et J8), en effet l'instabilité augmentant cela peut permettre de mettre en évidence des pics que l'on ne voyait pas à J0.

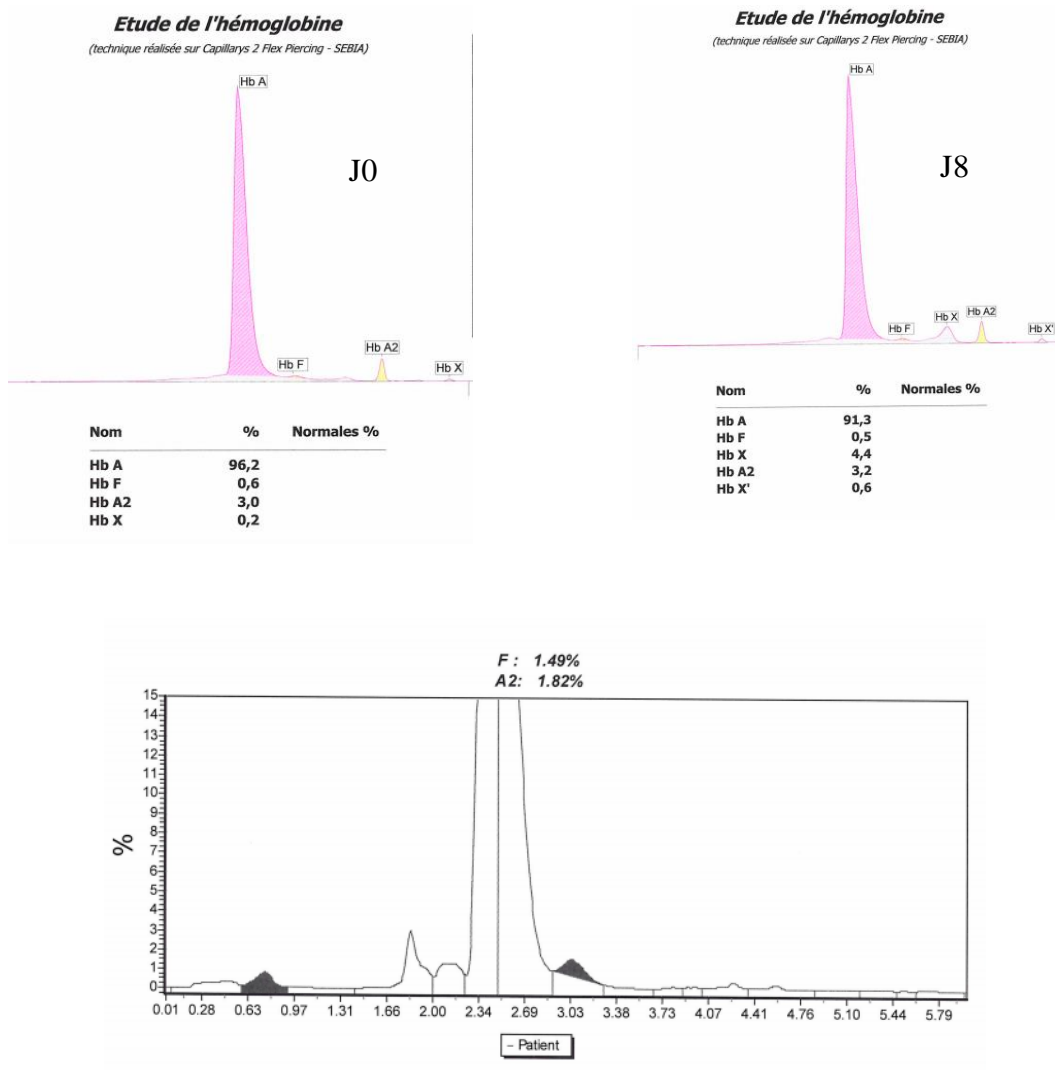


Figure 34 : Variant d'hémoglobine Sydney en CLHP et en électrophorèse capillaire à J0 et J8

Clinique : Le variant Sydney étudié dans notre série ne semble pas être à l'origine de complications importantes. Le diagnostic étant fait chez des adultes (patients B1, B2 et I2) semble être en faveur d'une symptomatologie « moins sévère » que pour d'autres variants où les signes cliniques sont présents dès l'enfance. Seul le patient I2 commence à présenter une surcharge martiale liée à l'érythropoïèse inefficace (jamais transfusé) et des calculs vésiculaires ont été mis en évidence en 2013.

- **Hémoglobine Terre Haute : Beta 106 Leu>Arg**

Ce variant concerne une de nos patientes (**patiente C**) qui est suivie depuis l'enfance, la RAHB était refaite chez nous en 2013. Il s'agit d'une néo-mutation chez cette patiente. L'hémoglobine Terre Haute est un variant très instable dont le tableau clinique est similaire à une β -thalassémie intermédiaire.

Biologie : Le taux d'hémoglobine de base de la patiente C est d'environ 6 g/dL en l'absence de transfusion.

Au niveau du diagnostic du variant, la RAHB n'est pas du tout informative, il s'agit d'un variant neutre aussi bien en électrophorèse capillaire, qu'en CLHP qu'en isoélectrofocalisation. Le séquençage du gène β a permis de mettre en évidence la mutation et de poser le diagnostic définitif.

Clinique :

D'une part, la patiente a été cholécystectomisée en 1980 suite à la migration d'une lithiase vésiculaire. D'autre part, les complications de ce variant sont dominées par une insuffisance veineuse chronique des membres inférieurs avec une ulcération chronique de la malléole. Cette ulcération a été longtemps évolutive à partir de 1998 jusqu'à la cicatrisation en 2012. C'est l'introduction des transfusions régulières qui a permis la cicatrisation. Il s'agit donc d'un variant transfusion-dépendant avec transfusion de 2 CGR toutes les 3-4 semaines.

- **Hémoglobine Saint-Etienne : Beta 92 His>Gln**

Une patiente d'origine maghrébine (**patiente D**) est porteuse de ce variant, nous ne connaissons pas l'histoire familiale et ne savons donc pas si d'autres membres de sa famille sont également atteints. Son hémoglobinopathie est connue depuis l'enfance mais la RAHB a été refaite dans notre laboratoire en 2013 dans le cadre d'un suivi et d'un désir de grossesse de la patiente.

Biologie :

Le taux d'hémoglobine de base de notre patiente se situe aux alentours de 9 g/dL

La RAHB est informative, en effet le variant migre sous la forme de 3 pics en électrophorèse capillaire (X, X', X'') et sous la forme d'un pic majoritaire à 12% en CLHP (Fig.35)

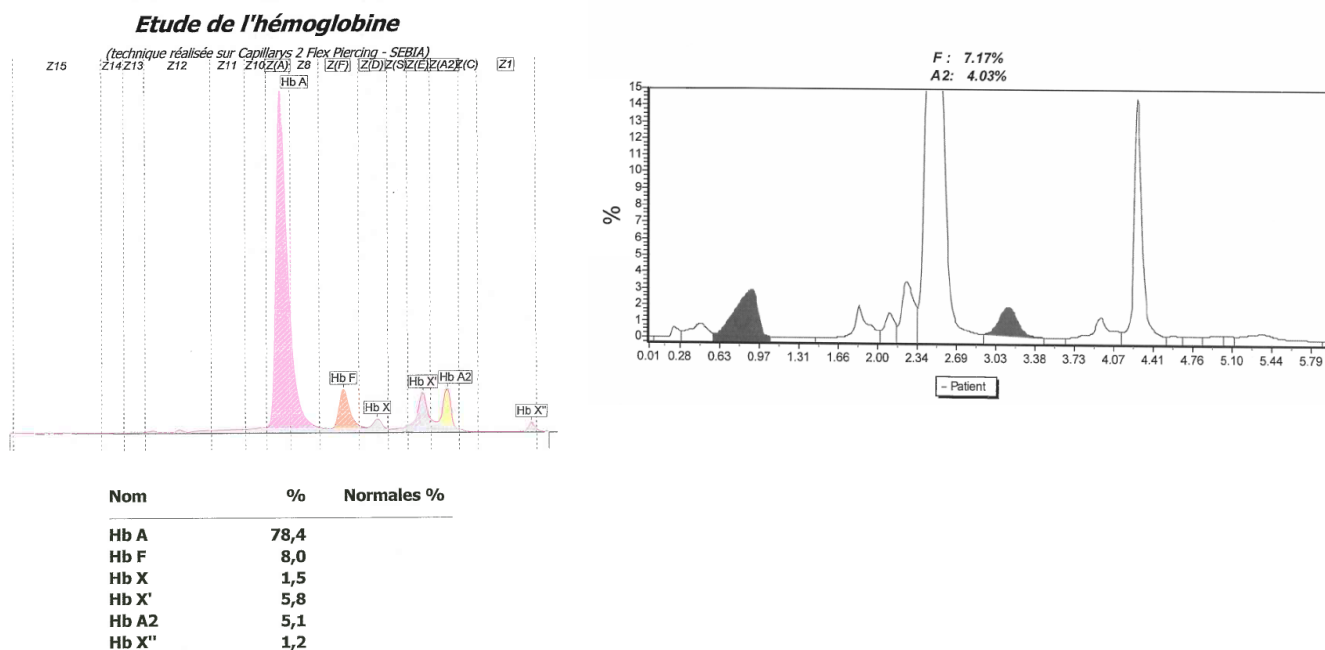


Figure 35 : Variant Saint-Etienne en électrophorèse capillaire et en CLHP

Clinique :

Au niveau des complications elle a présenté dans son enfance une crise d'hémolyse aigüe suite à une prise d'aspirine ayant nécessité une transfusion de CGR. Plusieurs crises d'hémolyse suite à des infections ont nécessité le recours à la transfusion. Elle a présenté en 2013 un SCA non ST+ et il est évoqué la notion d'angor d'effort qui pourrait être en lien avec son variant.

- **Hémoglobine Perth: Beta 32 Leu>Pro**

Le patient porteur de ce variant (**patient E**) est connu depuis l'enfance et l'électrophorèse n'a jamais été refaite dans notre laboratoire mais il était tout de même suivi à Lille dans le cadre de son hémoglobinopathie et un test d'instabilité avait été réalisé au laboratoire. C'est un patient pour qui on ne retrouve pas d'histoire familiale d'hémoglobinopathie, le diagnostic a été posé à l'âge de 5 ans suite à la découverte d'une anémie hémolytique chronique de sévérité importante.

Le taux d'hémoglobine de base pour ce variant est d'environ 10 g/dL

La splénectomie a été réalisée dès l'âge de 5 ans.

Ce patient a présenté de nombreuses complications. En 1996, devant la consommation excessive de boissons contenant de la quinine, il a présenté une hémolyse aigüe nécessitant le recours à la transfusion. Suite à l'apport transfusionnel mais surtout à cause d'une érythropoïèse inefficace il a présenté une surcharge martiale avec surcharge du cortex rénal traitée par saignées.

Le patient E a également eu des complications lithiasiques et a été cholécystectomisé en 2002

Les complications les plus graves et importantes étaient thrombotiques. En effet, ce patient est porteur de la mutation du FV Leiden à risque thrombotique qui a dû aggraver la symptomatologie thrombotique du variant. Il a notamment été victime de 3 EP à 21 ans, 28 ans, 30 ans qui se sont compliquées d'HTAP. Il a présenté une ulcération malléolaire et un priapisme pris en charge par Effortyl® et drainage des corps caverneux. Ce patient est décédé à un âge jeune de 34 ans suite aux complications de l'HTAP liée à l'hémolyse chronique ayant entraîné une vasoconstriction et une privation de NO. L'embolisme du patient a aussi aggraver l'HTAP (89).

Ce patient recevait de l'hydroxycarbamide au long cours ainsi que des traitements anti-coagulant et antiagrégants plaquettaires pour limiter le risque thrombotique.

- **Hémoglobine Burke : Beta 107 Gly>Arg**

Une seule patiente de notre étude rétrospective est porteuse de ce variant, (**patiente F**). Elle est issue d'une fratrie nombreuses (7 frères et sœurs) dont aucun membre ne présente de symptomatologie. Les circonstances de la recherche d'une hémoglobinopathie étaient la découverte d'une anémie dans un contexte d'asthénie et de douleurs abdominales fluctuantes chez une patiente alors âgée de 18 ans.

Biologie :

Le taux d'hémoglobine de base de ce variant est de 10 g/dL

La RAHB était réalisé en 2006 était informative, on retrouvait en effet une Hb X à 30% en électrophorèse capillaire, ce qui posait le diagnostic d'une hémoglobinopathie.

La caractérisation moléculaire du variant a été difficile, un envoi à l'Hôpital Henri-Mondor de Créteil a été nécessaire. L'hémoglobinopathie a dans un premier temps été étiquetée Hb Presbytarian (Beta 106 Asn>Lys) d'affinité diminuée pour l'oxygène puis le diagnostic définitif a été posé en 2011 : Hb Burke (Beta 107 Gly>Arg).

Clinique : Cette patiente âgée de 19 ans n'a pas présenté de complications ou de signes cliniques qui pourraient être en lien avec l'hémoglobinopathie en dehors d'une lithiase vésiculaire en 2011, elle n'a pas été cholécystectomisée.

- **Hémoglobine Evans : Alpha₂ 62 Val>Met**

Il s'agit ici d'un variant que l'on a identifié chez plusieurs membres d'une même famille (**G1, G2, G3, G4**). Le diagnostic s'est fait dans l'enfance lors d'un épisode hémolytique sur malaise digestif pour toute la famille (patients G1 et G2) et leurs deux sœurs (qui ne sont pas suivies) (Fig.36).

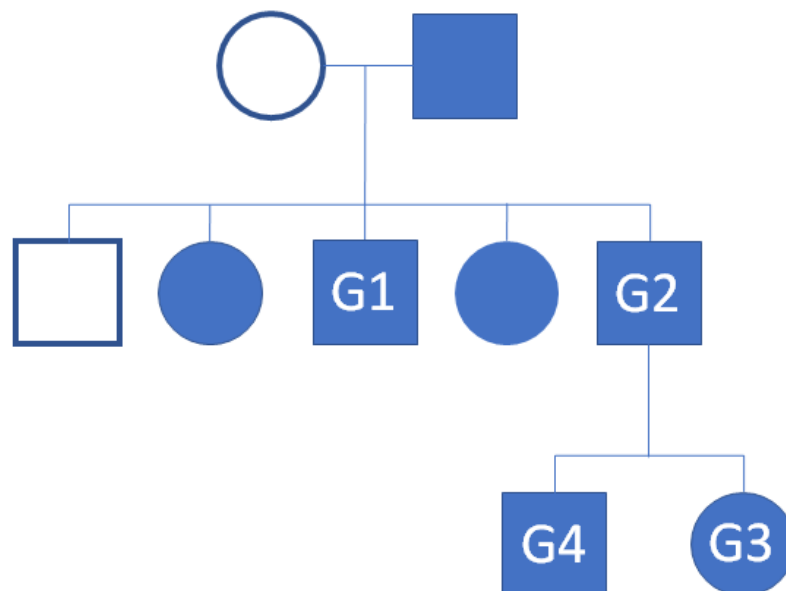


Figure 36 : Arbre génétique famille porteuse du variant Evans

Biologie :

Le taux d'hémoglobine de base de ce variant est élevé, environ 12 g/dL.

Nous avons fait l'étude de l'hémoglobine qui n'est pas informative pour ce variant, même en passant le tube plusieurs jours consécutifs en CLHP et électrophorèse capillaire.

Clinique :

Les complications lithiasiques concernent les patients G1, G2 et G3. Les patients G1 et G2 ont été cholécystectomisés à 43 ans et 52 ans, le patient G3 à l'âge de 9 ans. Le patient G3 présente une maladie de Gilbert associée ce qui a pour conséquence d'accentuer l'ictère cutané lié à l'hémoglobinopathie, une tentative de traitement par GARDENAL® a été entreprise pour tenter de diminuer l'ictère mais sans résultat important.

Le patient G2 a été victime de deux EP à 46 ans qui se sont d'emblée compliquées d' HTAP, il avait alors comme unique autre facteur de risque CV une dyslipidémie. C'est le seul patient de la famille qui avait été splénectomisé à l'âge de 18 ans.

La patiente G4 a été transfusée suite à une érythroblastopénie infectieuse à Parvovirus B19.

- **Hémoglobine Templeuve : Beta 139-140 Asn-Ala>Thr**

L'hémoglobine Templeuve a été décrite et découverte pour la première fois chez **la patiente H**. Il s'agit d'un variant découvert chez une patiente sans histoire familiale qui présentait une anémie hémolytique sévère depuis l'âge de 8 ans. C'est à l'âge de 31 ans que le diagnostic a été posé. Il s'agit d'un variant hyperinstable.

Biologie :

Le taux d'hémoglobine basal de la patiente est d'environ 6,7 g/dL. La RAHB est totalement silencieuse, il s'agit d'un variant neutre, seule la biologie moléculaire a permis de mettre en évidence cette hémoglobinopathie.

Clinique :

La patiente a été transfusée à de nombreuses reprises et l'est maintenant de manière régulière (environ tous les deux mois pour maintenir un taux d'Hb > 7 g/dL). Elle a été splénectomisée à l'âge de 2 ans et cholécystectomisée à l'âge de 29 ans.

Elle a présenté un foyer d'hématopoïèse extra-médullaire résolutif sous Hydroxycarbamide (90).

- **Hémoglobine Hammersmith : Beta 42 Phe>Ser**

La **patiente J** est porteuse de ce variant, le diagnostic a été fait dès l'âge de 4 mois dans un contexte de découverte d'anémie importante avec une saturation percutanée basse. Il s'agit d'une mutation *de novo* ; les parents et le frère aîné ne présentent pas d'anomalie. L'Hb Hammersmith est une hémoglobine très instable responsable d'anémie hémolytique sévère, la substitution d'une phénylalanine par une sérine affecte le contact au niveau de la poche de l'hème. Il y a aujourd'hui une quinzaine de cas décrits, les patients ont une origine ethnique différente, la mutation concerne d'avantage les filles (un cas décrit chez un garçon) (91) et ce sont toutes des mutations *de novo* (92).

Biologie : Cette patiente présentait un taux d'Hb aux alentours de 7-7,5 g/dL avant la splénectomie en 2009, après splénectomie le taux d'Hb est de 8,5-9 g/dL.

La RAHB n'était pas informative lors de sa réalisation en 2004, en revanche, le diagnostic a été évoqué très rapidement en raison d'un test d'instabilité positif. Le séquençage moléculaire a permis d'identifier clairement le variant responsable de l'anémie hémolytique.

Clinique : L'hémoglobine Hammersmith est responsable d'une anémie hémolytique sévère qui était transfusion dépendante avant la splénectomie de la patiente réalisée en 2009 (tous les deux mois environ pour maintenir une Hb > 8 g/dL). Depuis la splénectomie, la patiente n'a plus été transfusée.

- **Hémoglobine Bibba : α_2 136 Leu>Pro**

Le **patient K** est un hétérozygote composite Hb Bibba et trait α -thalassémique. La recherche de l'hémoglobinopathie s'est fait dans le cadre de la recherche de l'étiologie d'une anémie

hémolytique microcytaire chez un enfant de 2 ans. Le diagnostic a été long et difficile, après avoir éliminé toutes les autres causes d'anémie hémolytique, le variant a été identifié en 2009 (soit 5 ans après la découverte de l'anémie). La particularité de ce patient est d'être à la fois porteur d'une délétion au locus α -globine transmis par son père et d'une hémoglobine Bibba transmise par sa mère. Le patient a un frère et une sœur qui sont exclusivement porteurs de l'hémoglobine instable.

Biologie : Le patient K présente un taux d'hémoglobine basal de 9 à 10 g/dL.

La RAHB n'était pas informative pour ce variant, on notait cependant une HbA₂ diminuée (2,14%) compatible avec un trait α -thalassémique. Le séquençage du gène β réalisé dans notre laboratoire ne permettait pas de faire le diagnostic, nous avons décidé d'envoyer le prélèvement à Créteil pour le séquençage des gènes α .

Clinique : Le patient a été splénectomisé en 2007 avant que le diagnostic d'hémoglobine instable soit fait. Il a présenté des complications lithiasiques en 2017 et une cholécystectomie a été réalisée.

Il a été transfusé une fois suite à une infection qui avait provoqué une hémolyse importante avec un taux d'Hb à 5,4 g/dL.

Une chose importante est à noter, l' α -thalassémie augmente fortement l'instabilité du variant. En effet, les membres de sa famille uniquement porteur du variant BIBBA (mère et frère et sœur) sont totalement asymptomatiques.

3. Conclusion variants instables

Les variants d'hémoglobine instables contrairement aux variants d'hémoglobine hyperaffines sont généralement diagnostiqués dès l'enfance. Seulement 4 patients ont été diagnostiqués à l'âge adulte pour un variant qui semble « moins sévère » : Hémoglobine Sydney : patients B1, B2 et I2 et une patiente diagnostiquée à l'âge de 18 ans pour une Hb Burke. Les circonstances de diagnostic sont dans la plupart des cas, une histoire familiale (Hémoglobines Santa-Ana, Evans, Sydney), il peut également être fait dans le cadre d'une anomalie de la saturation à l'oxymètre de pouls (patients J et I1), devant des signes cliniques d'hémolyses, de douleurs abdominales ou devant une anémie biologique.

Notre étude rétrospective fait état de 10 variants, qui concernent 21 patients issus de 11 familles différentes. Le diagnostic est parfois difficile est long, c'est le cas pour notre patient porteur d'une hémoglobine Bibba (patient K), l'anémie microcytaire a été mise en évidence en 2004 et le diagnostic final porté en 2009.

Les techniques électrophorétiques de notre laboratoire étaient peu informatives et permettaient de mettre en évidence les hémoglobines Santa-Ana, Sydney, Evans (après plusieurs jours), Saint-Etienne, Burke. On note qu'il est intéressant de refaire l'analyse (CLHP et Electrophorèse capillaire) à J2, J5 et J8 lorsque l'on suspecte un variant instable, cela permet d'augmenter l'instabilité dans le tube et de mettre en évidence certains variants . Le test d'instabilité était réalisé et positif pour 12 patients et la recherche de corps de Heinz positive chez 6 patients. Ces deux examens peuvent donner une indication et peuvent aider le clinicien et le biologiste dans la démarche diagnostique. Dans tous les cas, le séquençage des gènes β en première intention puis α reste indispensable pour poser le diagnostic final.

Le taux d'hémoglobine moyen de ces variants instables de sévérité variable était de 10,3 g/dL mais pouvait aller de 6 g/dL (hémoglobine Terre Haute) à 13 g/dL (Hémoglobine Evans). De même les taux de bilirubine et de LDH varient selon les variants, le taux d'haptoglobine étant dans la plupart des cas effondré.

Notre série rétrospective est « peu conséquente » en nombre de patients, mais fait tout de même état d'un haut niveau de complications. En effet, on dénombre pour nos 21 patients ,11 splénectomies. Dans certains cas, cela a permis l'arrêt du recours aux transfusions chez une patiente âgée de 13 ans splénectomisée à l'âge de 5 ans porteuse d'une Hb Hammersmith. Dans d'autres cas, la splénectomie est à l'origine de complications dramatiques. Un patient (A4) âgé de 40 ans, porteur d'une Hb Santa-Ana, splénectomisé à l'âge de 9 ans, suivi régulièrement a été hospitalisé en réanimation suite à une pleuro-pneumopathie infectieuse associée à une hémolyse aigüe importante, une défaillance multi-viscérale et des séquelles néphrologiques graves (Insuffisance Rénale terminale).

Les complications lithiasiques liées à l'hémolyse chronique sont également importantes : 10 patients ont été cholécystectomisés suite à des complications lithiasiques, une patiente âgée de 42 ans (A3) porteuse d'une Hb Santa Ana présente une lithiase intra-hépatique très sévère.

Nous avons également pu relever des complications de surcharge martiale, cela s'explique par deux phénomènes. D'une part cette surcharge concerne des patients polytransfusés, d'autre

part elle s'explique par une érythropoïèse inefficace. 6 patients ont présenté des signes biologiques et/ou IRM de surcharge martiale, un patient avait une surcharge au niveau du cortex rénal (patient E).

Les complications thrombotiques étaient nombreuses également. En effet, 7 patients ont eu des pathologies thrombotiques. Ces complications survenaient à un âge relativement jeune : 37 ans en moyenne pour la 1^{ère} thrombose, elles concernaient aussi bien des femmes que des hommes. Dans notre série, on relevait des phlébites des membres inférieurs chez des patients jeunes (Hb Santa-Ana). Une femme porteuse d'une Hb Terre Haute (patiente C) présentait une insuffisance veineuse chronique du membre inférieur avec une ulcération chronique de la malléole interne gauche, longtemps évolutive (de 1998 à 2012) résolue suite à l'instauration des transfusions sanguines. Un autre patient porteur d'une Hb Perth (patient E) présentait également une ulcération malléolaire. Ce même patient était victime de trois embolies pulmonaires (à l'âge de 21 ans, 28 ans et 30 ans) compliquées d'HTAP. Un patient porteur d'une Hb Evans faisait également deux EP à un âge de 46 ans (patient G1) d'emblée compliquée d'HTAP. On relevait aussi un priapisme chez le patient porteur de l'Hb Perth. Les complications thrombotiques étaient à l'origine de 3 décès dans notre série à des âges jeunes : 34 ans du fait des complications de l'HTAP (Hb Perth), 48 ans des suites d'une embolie pulmonaire (mère du patient A1 : Hb Santa-Ana), 64 ans suite à un infarctus mésentérique du grêle opéré.

On note aussi comme complications des foyers d'hématopoïèse extra-médullaire chez deux patients.

La prise en charge et le suivi de ces patients est pour le moment totalement empirique, elle repose pour notre étude en premier lieu sur l'éviction des médicaments et autres agents oxydants pour éviter la survenue de crises hémolytiques (Liste transmise dès la première consultation). 6 patients sur 21 ont déjà reçu des culots globulaires suite à des épisodes hémolytiques occasionnels tels que des infections, des opérations, des consommations d'agents oxydants. 3 variants sont quant à eux transfusions dépendants ; il s'agit de l'Hb Terre Haute (les transfusions ont permis la cicatrisation de l'ulcère malléolaire de la patiente), l'Hb Templeuve, et l'Hb Hammersmith (patiente régulièrement transfusée avant sa splénectomie). 4 patients ont reçu de l'hydroxycarbamide au long cours et bien entendu les traitements antiagrégants plaquettaires et les anticoagulants sont prescrits chez les patients qui ont présenté (ou qui sont à risque de présenter) des complications cardiovasculaires.

Patient	DDN et date de diagnostic	Type d'Hb Instable	Circonstances de découverte	Splénectomie	Complications liées à la surcharge martiale	Complications lithiasiques	Complications thrombotiques	Autres signes cliniques et complications, commentaires, taux d'hémoglobine de base	Prise en charge thérapeutique
A1	26/11/1934 RAHB 1998	Santa Ana	Diagnostic familial	1963	Ferritinémie > 1000 µg/L en 1998		AIT de l'hémicorps droit en 1981 AVC superficiel sylvien gauche en 1998 Décès en 1998 (64 ans) d'un infarctus mésentérique du grêle opéré	Hb = 12 g/dL	Patient non suivi pendant de nombreuses années Coumadine® et Kardegic® pour la thrombocytose Spéciafoldine®
A2	24/09/1926 RAHB 1998	Santa Ana	Diagnostic familial	Toujours refusée par le patient (décès de sa fille et de son frère)				Hypersplénimise Hématopoïèse splénique objectivée en 2000 Hb = 7 g/dL (hypersplénisme)	Transfusions : 1980, 1997 (pneumopathie) Hydrea® introduit en 2000 Spéciafoldine®
A3	22/04/1975 Suivie depuis l'enfance RAHB 2013	Santa Ana	Diagnostic familial	1985		Lithiases vésiculaire et cholédocienne, cholecystectomie en 1997 Angiocholite aigüe en 2013 Lithiase Intra-hépatique très sévère	Phlébite superficielle du membre inférieur en début de grossesse	Fausse couche en avril 2013 Hb : 10 g/dL	Jamais transfusée Spéciafoldine®
A4	09/03/1977 Diagnostic dans l'enfance	Santa Ana	Autres cas familiaux, mère porteuse décédée à 48 ans de complications emboliques	1986		Cholécystectomie sur colite hépatique		Hémolyse aigüe importante et détresse respiratoire sur pneumopathie infectieuse, réanimation CHU Lille en 09/17, Défaillance multiviscérale avec CIVD Thrombophlébite septique IRA (hémoglobinurie) Hb : 11 g/dL	Eupressyl®, Loxen®, Captopril®, calciparine® suite à l'hospitalisation de septembre 2017 Transfusions :- 11 CGR en tout depuis l'enfance à 2013 (hémolyse post-op en 2000) -1 culot le 25.10 .17

Patient	DDN et date de diagnostic	Type d'Hb Instable	Circonstances de découverte	Splénectomie	Complications liées à la surcharge martiale	Complications lithiasiques	Complications thrombotiques	Autres signes cliniques et complications, commentaires, taux d'hémoglobine de base	Prise en charge thérapeutique
A5	26/08/1971	Santa Ana	Diagnostic familial	1986			Phlébite spontanée du membre supérieur gauche	Hb=11g /dL	
A6	08/09/2014 RAHB 2015	Santa Ana	Diagnostic familial					Ictère néonatal avec bilirubine à 150 mg/l Hb : 9 g /dl	Speciafoldine®
B1	15/11/1989 RAHB 2014 BM 2015	Sydney	Mère atteinte, diagnostic devant épisodes d'asthénie, diarrhées, perte de poids, urines foncées	Souhait de splénectomie				Episodes d'hémolyse avec asthénie intense, douleurs abdominales, courbatures, ictère cutané modéré Hb = 12g/dL	
B2	10/01/1995 RAHB 2017 BM 2017	Sydney	Diagnostic chez son cousin (patient F)					Janvier 2016 présente des douleurs de l'hypochondre gauche et une splénomégalie modérée Signes cliniques d'hémolyse modérés (Hb normale) Fumeur (1 paquet/jour) Hb = 13 g/dL	
C	20/01/1973 Suivi depuis l'enfance (Néo-mutation) RAHB en 2003	Terre Haute	Néo-mutation, variant très instable, donne un tableau de β -thalassémie intermédiaire	1980	Mutation HFE C282Y qui aggrave la tendance spontanée à la surcharge martiale	Cholécystectomie 1980	Ulcération chronique de la malléole interne gauche, insuffisance veineuse chronique des membres inférieurs à partir de 1998, totalement cicatrisé en 2012	Hb = 6g/dL	Transfusions : (2 CGR toutes les 3-4 semaines, instauré suite à l'ulcération. Objectif Hb > 8g/dl

Patient	DDN et date de diagnostic	Type d'Hb Instable	Circonstances de découverte	Splénectomie	Complications liées à la surcharge martiale	Complications lithiasiques	Complications thrombotiques	Autres signes cliniques et complications, commentaires, taux d'hémoglobine de base	Prise en charge thérapeutique
D	08/05/1971 connue depuis l'enfance RAHB 2012	Saint-Etienne				Cholécystectomie en 2000	Janvier 2013 ; SCA non ST+ à troponines positives Notion d'angor d'effort chronique en lien avec le variant (grande instabilité et hyperaffinité)	IRA sur un épisode d'hémolyse aigüe (prise d'aspirine à l'âge de 10 ans) Hb = 9g/dL	Hydrea® instauré en 2013 (arrêt 2014 pour désir de grossesse) Transfusions lors de plusieurs épisodes hémolytiques (2012 irritation ORL + fièvre, Hb = 6,5 g/dL 3 CGR) β Bloquant et IEC
E	23/06/1970	Perth		1975	1996 : surcharge en fer liée aux apports transfu mais surtout à l'érythropoïèse inefficace Surcharge en fer du cortex rénal Traitement par saignées (hebdomadaires de juin 96 à oct 96, mensuelles de oct 96 à août 97)	Lithiase vésiculaire en 1995 Cholécystectomie en 2002	EP en mai 1991 puis en janvier 1998 puis en janvier 2000 HTAP, cœur pulmonaire chronique post embolique Ulcère malléolaire Priapisme (traitement par Effortyl® puis drainage des corps caverneux) Décès 2004 suite aux complications de l'HTAP	Mutation FV Leiden Hb = 10 g/dL	Préviscan® à vie Plavix instauré en 09/1999 arrêt en 10/2000 (majoration de l'anémie) Kardegic® Hydrea® instauré en 1990, switch par Vercyte® (01/98 à 03/98), reprise Hydrea®, arrêté en 2001 pour désir de grossesse Speciafoldine® Transfusions : 1996 : consommation++ de boissons contenant de la quinine et épisode infectieux 2000 : majoration de l'anémie
F	05/02/1988 RAHB en 2006, BM en 2011	Burke	Douleurs abdominales, asthénie dans un contexte d'anémie			Lithiase vésiculaire en mai 2011		Hb = 10g/dL	Speciafoldine®
G1	23/02/1965 Suivi depuis 1981 pour anémie hémolytique non étiquetée, RAHB en 2000	Evans	Tableau identique chez toute la famille (2 sœurs, 1 frère), en 1980 malaise digestif lors d'un séjour à Poitiers : épisode hémolytique++		04 /2017 : ferritinémie : 613 µg/L IRM hépatique : 76 µmol/g	Cholécystectomie en 2008	Echographie cardiaque en 2017 : absence d'HTAP, rétrécissement aortique sans lien avec l'Hb instable	Hb : 12g/dL	Speciafoldine®

Patient	DDN et date de diagnostic	Type d'Hb Instable	Circonstances de découverte	Splénectomie	Complications liées à la surcharge martiale	Complications lithiasiques	Complications thrombotiques	Autres signes cliniques et complications, commentaires, taux d'hémoglobine de base	Prise en charge thérapeutique
G2	01/02/1964 Suivi depuis 1987 RAHB :2000-2011 BM 2002	Evans	Contexte familial	1982		Cholécystectomie 2016 : colique néphrétique gauche lithiasique	2 EP en 2010 d'emblée compliquée d'HTAP	Dyslipidémie non traitée lors de l'EP Hb=13g/dL	Previscan® Speciafoldine®
G3	27/11/1997 RAHB en 2001	Evans	Contexte familial, douleurs abdominales, vomissements, aggravation de l'anémie dans un contexte infectieux			En 2005 : hospitalisation pour migration d'une lithiase vésiculaire Cholécystectomie en 2006		Constipation importante de l'enfance jusqu'à 15 ans. Ictère conjonctival marqué (essai traitement par GARDENAL® en 2008) Hb = 12g/dL	Speciafoldine®
G4	18/10/1992 RAHB en 2000	Evans	Contexte familial					Ictère conjonctival très marqué, ictère cutané plus modéré : maladie de Gilbert associée. Traitement par GARDENAL® sans grande amélioration Hb : 12g/dL	Speciafoldine® Transfusions : Décembre 2001 Hb=6,6g/dL, érythroblastopénie infectieuse (Parvovirus B19)
H	08/02/1964 Suivie depuis 1993 RAHB en 1993, 2006, 2008 BM en 1996	Templeuve	Hémolyse chronique depuis l'enfance	1966	Surcharge martiale liée aux transfusions IRM hépatique 2016 : 413 µmol/g IRM cardiaque 2014 ; bonne maîtrise de la surcharge myocardique	Cholécystectomie en 1993		Foyer d'hématopoïèse extra-médullaire en 1993 disparu sous Hydrea® Hb : 6,5-7,5 g/dL	Speciafoldine® Hydrea® Kardegic® Transfusions : Transfusions régulières pour maintenir Hb > 7g/dL, environ tous les 2 mois

Patient	DDN et date de diagnostic	Type d'Hb Instable	Circonstances de découverte	Splénectomie	Complications liées à la surcharge martiale	Complications lithiasiques	Complications thrombotiques	Autres signes cliniques et complications, commentaires, taux d'hémoglobine de base	Prise en charge thérapeutique
I1	17/05/2008 RAHB, BM en 2013	Sydney	SpO2 basse à l'oxymètre de pouls lors de la surveillance d'une anesthésie générale pour appendicectomie					Hb=10 g/dL	Speciafoldine®
I2	21/10/1980 RAHB, BM en 2013	Sydney	Père de la patiente I1		Ferritinémie : 548 µmol/g en 2013	Calculs vésiculaires mis en évidence en 2013		Hb=12 g/dL Tabagisme actif à 15 cig/jour	
J	03/06/2004 RAHB, BM en 2004	Hammersmith	Anémie et saturation percutanée basse Mutation de Novo	2009	Surcharge martiale liée aux transfusions (traitement par Desferal®)			Hb= 7-7,5 g/dL Hb = 9g/dL (après splénectomie)	Speciafoldine® Transfusions : Tous les deux mois AVANT la splénectomie Arrêt des transfusions après 2009
K	25/02/2002 BM en 2009	Bibba + α-thalassémie	Anémie microcytaire depuis 2004	2007 (avant le diagnostic)		Micro lithiases mises en évidence en 2017 Cholécystectomie en 2017		Trait α-thalassémique aggravant l'instabilité Hb = 9-10 g/dL	Speciafoldine® Transfusions : 2013 anémie à 5,4 g/dL post infectieuse

Tableau 10 : Résumé recueil de données hémoglobines instables

DISCUSSION

Les hémoglobinopathies, principalement représentées par les syndromes drépanocytaires et thalassémiques, comptent parmi les anomalies génétiques les plus fréquentes dans le monde ainsi qu'en France en raison des flux importants de populations.

Au vu de notre étude rétrospective, nous pouvons totalement confirmer que les deux types de variants que nous avons analysés sont des hémoglobinopathies rares. En effet, sur 1630 RAHB réalisées en 2016 nous avons diagnostiqué 4 Hb hyperaffines et aucune Hb instable, sur 1913 RAHB en 2017, une Hb hyperaffine et une Hb instable ont été identifiées (un variant hyperaffin Olympia a été identifié en janvier 2018). Cependant, nous pensons que ces variants et surtout les variants hyperaffins sont sous-diagnostiqués, la connaissance récente de ces variants tend à faire augmenter les recherches et à les placer dans le cheminement diagnostic des polyglobulies. En effet, comme nous l'avons souligné dans notre partie qui concerne les hémoglobines hyperaffines, 6 patients sur 12 ont été diagnostiqués ces deux dernières années (2016,2017 et une en janvier 2018), deux de ces patients étaient suivis depuis plusieurs années dans le même CH pour une polyglobulie sans étiologie, cela illustre bien le fait que cette étiologie entre dans l'arbre décisionnel de diagnostic de la polyglobulie.

Les techniques électrophorétiques que nous utilisons au laboratoire étaient informatives dans seulement 40% des cas : 3 Hb hyperaffines étaient mises en évidence : Hb Tak et Hb Coulumbia-Missouri, Hb Malmö), 4 Hb instables montraient des pics surnuméraires en électrophorèse capillaire ou CLHP (Santa-Ana, Sydney, Saint-Etienne, Burke). Le sous-diagnostic peut être en partie expliqué par la méconnaissance de ces variants par les laboratoires. L'étude des gènes en biologie moléculaire est donc totalement indispensable, il faut persévérer dans la démarche diagnostique en cas de forte suspicion, ne pas abandonner devant une électrophorèse « normale ».

Les variants instables et hyperaffins sont différents dans leur présentation clinique et dans leur sévérité. En effet, les Hb hyperaffines sont diagnostiquées à l'âge adulte (moyen de 44 ans) et souvent dans le cadre de la découverte d'une polyglobulie sur un bilan systématique. Alors que pour les variants instables l'âge au diagnostic et la sévérité dépendent du variant. Pour la plupart des patients que nous avons suivis, (Santa-Ana, Terre Haute, Saint-Etienne, Perth, Evans, Templeuve, Hammersmith, Bibba) le diagnostic a été fait dès la petite enfance au décours de signes cliniques d'anémie hémolytique. Pour deux autres variants : Hb Sydney, Hb Burke, le diagnostic a été fait chez des patients adultes qui présentaient donc des signes

cliniques plus modérés. Il existe une variabilité importante de la sévérité pour les hémoglobines instables.

Etant donné la rareté de ces variants, notre rétrospective a concerné un petit nombre de patients : 33 patients d'âge, de sexe et d'origine ethnique différents (21 Hb instables et 12 Hb hyperaffines). Cependant, cette série « peu importante » en nombre de patients a révélé un haut niveau de complications. Nos fiches de recueil de données nous ont permis de noter les complications liées à la surcharge martiale, complications lithiasiques pour les variants instables et les complications thrombotiques pour les variants hyperaffins et instables. 19 patients sur 33 ont présenté au moins une complication qui peut être rapportée à leur hémoglobinopathie (toutes complications confondues).

Finalement, 4 patients porteurs d'hémoglobine hyperaffine ont présenté des complications thrombotiques : Hb Pierre-Bénite (AVC), Hb San-Diego (phlébite des MI), Hb Columbia-Missouri (occlusion de la veine centrale de la rétine), Hb Olympia (AVC). Tous ces patients présentaient d'autres facteurs de risque CV. La prise en charge et le suivi de ces variants est totalement empirique, la prise en charge des facteurs de risque CV est primordiale, finalement on peut se demander si un suivi hématologique, cardiologique plus régulier ne serait pas bénéfique, surtout chez des patients plus âgés qui sont plus à risque de complications. Il faut également penser à effectuer chez les patients jeunes qui font des thromboses un bilan de thrombophilie. Un suivi cardiologique avec une exploration de la fonction cardiaque avec consommation d'oxygène au repos et à l'effort doit être effectué de manière régulière.

En ce qui concerne les variants instables nous avons montré que les complications étaient nombreuses avec n=6 patients qui ont eu des thromboses ; Hb Santa-Ana (AVC, infarctus mésentérique, phlébite des membres inférieurs et supérieurs, EP), Hb Terre Haute (insuffisance veineuse chronique au niveau des membres inférieurs), Hb Perth (EP, priapisme, HTAP), Evans (EP). Les complications lithiasiques étaient également nombreuses avec 10 patients cholécystectomisés. Les complications liées à la surcharge martiale étaient plus modérées et concernaient surtout les patients polytransfusés, seul un patient (Hb Perth) a dû bénéficier de saignées pour diminuer cette surcharge.

Le suivi et les traitements de ces patients sont également totalement empiriques et cliniciens dépendants. Selon les variants, des transfusions régulières sont nécessaires pour maintenir un taux d'hémoglobine convenable, un traitement par hydroxycarbamide peut s'avérer efficace (notamment pour éliminer un foyer d'hématopoïèse secondaire), 4 patients ont été traités par

cette molécule (Hb Templeuve, Hb Perth, Hb Saint-Etienne, Hb Santa-Ana). Mais aucun consensus n'est réellement établi. On sait que l'éviction des agents oxydants est primordiale, la réalisation régulière d'une échographie abdominale à la recherche d'une lithiase et pour mesurer précisément le volume de la rate est importante, de même que des échographies cardiaques à la recherche d'une HTAP. Une consultation hématologique régulière et une NFS tous les 6 mois et à la moindre anomalie clinique devraient être mises en place. Au vu de notre expérience avec cette étude rétrospective, on pourrait dire qu'un suivi plus régulier des patients devrait être fait, en particulier pour certains variants pour qui les patients ont été victimes de complications importantes (Santa-Ana, Perth, Templeuve, Terre Haute) ainsi que pour certains patients (plus âgés, splénectomisés, ayant des facteurs de risque associés, anomalie constitutionnelle de l'hémostase associée...). C'est pour cette raison que notre objectif est la diffusion des fiches de recueil de données au niveau national et européen pour établir un registre de patients importants et ainsi établir un consensus sur les délais de suivi, les traitements selon tel ou tel variants. On a longtemps pensé qu'il s'agissait de variants « neutres » mais au vu de nos observations, on remarque que les complications ne sont pas si rares et concernent quand même un bon nombre de patients. En effet, 60% des patients ont présenté au moins une complication liée à leur hémoglobinopathie. La splénectomie doit être demandée en cas d'hypersplénisme important, les patients qui ont fait des complications thrombotiques sont des patients splénectomisés. Par exemple, dans la famille porteuse du variant Evans, le patient splénectomisé est le seul à avoir fait une embolie pulmonaire. Les consultations régulières permettent aussi de faire le point sur l'observance au traitement prescrit, notamment aux antiagrégants plaquettaires.

ABREVIATIONS

2-3 BPG : 2,3 Bisphosphoglycérate
2-3 DPG : 2,3 Disphosphoglycérate
AH : Anémie hémolytique
AHSP : Alpha hémoglobin stabilizing factor
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdiens
AVC : Accident vasculaire cérébral
CGR : Concentrés de globules rouges
CLHP : Chromatographie liquide haute performance
CV : Cardio-vasculaire
CVO : Crise vaso-occlusive
ddNTP : Didéoxyribonucléotides tri-phosphates
dNTP : Déoxyribonucléotides tri-phosphates
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
EP : Embolie pulmonaire
EPO : Erythropoïétine
ET-1 : Endothéline 1
G6PD : Glucose-6-phosphate déshydrogénase
HIF : Facteurs induits par l'hypoxie
HPN : Hémoglobinurie paroxystique nocturne
HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire
HS : Séquence Hypersensible
IEF : Isoélectrofocalisation
IMC : Indice de masse corporelle
JAK2 : Janus kinase-2
LCR : Locus Control Region
MAT : Microangiopathie thrombotique
MCS-R : Multispecies Conserved Sequence
NF : Numération formule
NO : Monoxyde d'azote

PCR : Polymerase chain reaction

PG : Polyglobulie

PHHF : Persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale

RAHB : Recherche d'une anomalie de l'Hémoglobine

SCA non ST+ : Syndrome coronarien aigu sans sus-décalage du segment ST

SDM : Syndrome drépanocytaire majeur

STA : Syndrome Thoracique aigu

TI : Thalassémie intermédiaire

TM : Thalassémie majeure

TNTD : Thalassémie non transfusion dépendante

ANNEXES

Annexe 1



POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE

L'expertise du CHU au service de la région.

INSTITUT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

- SECTEUR PROTEINES, BIOLOGIE PREDICTIVE : HEMOGLOBINOPATHIES -

☎ 03.20.44.54.54 Poste 34097

RECHERCHE D'UNE ANOMALIE DE L'HEMOGLOBINE

BIOLOGISTES : Dr François LOISELEUR 03.20.44.52.08 - Dr Patrice MABOUDOU 03.20.44.65.46 - Dr Claude MEREAU 03.20.44.54.54 Poste 38349

IDENTITE PATIENT (ETIQUETTE)	MEDECIN PRESCRIPTEUR (TAMPON)	ORGANISME DEMANDEUR (TAMPON)								
Nom :	Nom :	Nom :								
Nom d'épouse :	Adresse :	Adresse :								
Prénom :								
Né(e) le : <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table>									Votre référence :
Sexe : <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M	☎	☎								

PRELEVEMENT(S)

Date

--	--	--	--	--	--	--	--

 et heure

--	--	--	--

 de prélèvement

EXAMENS DEMANDES

- ETUDE STANDARD DE L'HEMOGLOBINE ET/OU RECHERCHE D'UN VARIANT D'HEMOGLOBINE
 - DOSAGE HEMOGLOBINE S DOSAGE HEMOGLOBINE F AUTRE DOSAGE (PRECISER)
 - RECHERCHE D'HEMOGLOBINE INSTABLE (Test à l'isopropanol) (prendre RDV avec le Laboratoire)
 - CARACTERISATION MOLECULAIRE Diagnostic de l'HEMOGLOBINOPATHIE :
- + Renseignements cliniques obligatoires (origine géographique, lien de parenté pour les études familiales)
 + consentement signé obligatoire pour chaque personne testée

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES

Diagnostic connu ou présumé : THALASSEMIE DREPANOCYTOSE VARIANT DE L'HEMOGLOBINE

RENSEIGNEMENTS INDISPENSABLES POUR LA REALISATION DES EXAMENS

- DONNEES HEMATOLOGIQUES : (ou Joindre copie d'une numération récente)
 - HB
 - VGM
 - TGMH
 - CCMH
 - HEMATIES
 - LEUCOCYTES
 - PLAQUETTES
 - CORPS DE HEINZ
 - RETICULOCYTES
 - MORPHOLOGIE DES GR
- DONNEES BIOCHIMIQUES : préciser unité et valeurs normales (ou Joindre copie des résultats)
 - FER SERIQUE
 - FERRITINE
 - BILIRUBINE
 - AC FOLIQUE
 - VIT B12
- ORIGINE DES PARENTS : - Père : - Mère :
- HEMOGLOBINOPATHIE(S) CONNUE(S) DANS LA PARENTE ? OUI Si oui, préciser NON
- GROSSESSE EN COURS ? OUI Si oui, terme : NON
- HEMOLYSE ? OUI NON SPLENOMEGALIE ? OUI NON
- CARENCE MARTIALE ? OUI NON Traitée ? OUI NON
- TRAITEMENTS :
- Transfusion < à 4 mois ? OUI Si oui, nombre de culots : NON
- Autres (Préciser)

Annexe 2

Fiche de Recueil de données des Hémoglobines Hyperaffines

Identification du patient :

Nom (3 premières lettres) : /_/_/_/ Prénom (3 premières lettres) : /_/_/_/

Date de naissance : /_/_/ /_/_/ /_/_/_/_/

Pays de naissance :

Sexe : F M

Type d'hémoglobine hyperaffine :

Antécédents familiaux :

Autres cas d'hémoglobine hyperaffine dans la famille :

Oui : lien de parenté :

Non Ne sait pas

Antécédents de maladie cardiovasculaire chez les parents : Oui Non Ne sait pas

Âges et causes de décès des parents :

Père :

Mère :

Histoire de la maladie:

- Date de diagnostic de l'hémoglobine hyperaffine : /_/_/ /_/_/ /_/_/_/_/

Biologie au diagnostic :

Hb (g/dL) : Ht.....(%) PO₂50.....(mmHg)

Élimination des causes de PG acquises :

- Mutation Jak2 : Oui Non
- Culture des progéniteurs en absence d'EPO : Oui Non
- Taux d'EPO normal : Oui Non
- Autres.....

Signes biologiques/cliniques d'hémolyse : Oui Non Non recherché

Splénomégalie : Oui Non

Si oui, taille :

Pathologies du patient

- Facteurs de risque Cardiovasculaires associés : Oui Non Non connus
 - Tabagisme : Oui Non Ne sait pas
 - Hypertension artérielle : Oui Non Ne sait pas
 - Dyslipidémies : Oui Non Ne sait pas
 - Diabète : Oui Non Ne sait pas
 - Autres :
.....

- Anomalie Constitutionnelle de thrombophilie : Oui Non Non recherchée
 - FV Leiden
 - FII Leiden
 - Déficit en protéine C
 - Déficit en protéine S
 - Déficit en antithrombine
 -
 - Autre :

- Présence d'un ACC de type lupique, anticardiolipine, anti B2GPI : Oui Non
Ne sait pas
- Autres pathologies :

Complications de la maladie

Complications thrombotiques

Thromboses veineuses : Oui Non Ne sait pas

Historique :

Hypertension artérielle pulmonaire : Oui Non Ne sait pas

Thromboses artérielles : Oui Non Ne sait pas

Historique :

Signes d'hyperviscosité (Troubles auditifs, visuels, céphalées, syndrome de Raynaud...) :

Autres complications :

Prise en charge thérapeutique :

Saignées : Oui Non Ne sait pas

Rythme des saignées :

Traitement anticoagulant : Oui Non Ne sait pas

Historique :

Traitement antiagrégant plaquettaire : Oui Non Ne sait pas

Historique :

Autres traitements :

Etat du patient :

Vivant Décédé

Date du décès : /_/ /_/ /_/ /_/ /_/ Cause du décès : Suivi par :

Fiche de Recueil de données des Hémoglobines instables

Identification du patient :

Nom (3 premières lettres) : /_/_/_/ Prénom (3 premières lettres) : /_/_/_/

Date de naissance : /_/_/ /_/_/ /_/_/_/_/

Pays de naissance :

Sexe : F M

Antécédents familiaux :

Autres cas d'hémoglobine instable dans la famille :

Oui : lien de parenté :

Non Ne sait pas

Âges et causes de décès des parents :

Père :

Mère :

Histoire de la maladie :

Type d'hémoglobine instable :

Autre anomalie de l'hémoglobine associée :

Autres pathologies du patient :

Date de diagnostic : /_/_/ /_/_/ /_/_/_/_/

Circonstances de diagnostic :

Résultats de la première NF si disponible:

(NF au-delà de 1 an si découverte néonatale)

Hb (g/dL) :..... VGM (fl).....CCMH (g/dl).....

Réticulocytes (G/L).....

Leucocytes (G/L).....

Plaquettes (G/L).....

Morphologie érythrocytaire.....

Anémie néonatale : Oui Non Ne sait pas

Ictère néonatal : Oui Non Ne sait pas

Signes cliniques révélateurs (ictère, cyanose, poussées d'hémolyse, infection à Parvovirus, anomalie de saturation) :

Présence de signes cliniques d'hémolyse : Oui Non

Splénomégalie : Oui Non

Si oui, taille :

Splénectomie : Oui Non Ne sait pas

Date : /_/ /_/ /_/

Biologie de l'hémolyse :

Bilirubine libre :..... Haptoglobine..... LDH.....

Infection à Parvovirus : Oui Non Ne sait pas

Complications de la maladie:

Date des premiers symptômes : /_/_/ /_/_/ /_/_/_/_/

1. Surcharge martiale :

Ferritine > 1000 µG /L : Oui Non Ne sait pas

Dernier taux de ferritine disponible : Date : /_/_/ /_/_/ /_/_/_/_/

Coefficient de Saturation de la transferrine > 45% :

Oui Non Ne sait pas

1^{er} IRM hépatique :

Date : /_/_/ /_/_/ /_/_/_/_/

Résultats surcharge en fer hépatique µmol/ g

Contrôles :
.....

Retentissements :

Cardiaque (ECG, écho, IRM).....

Hépatique.....

Rénal.....

Prise en charge :

Traitement par chélateur : Oui Non Ne sait pas

Lequel :

Traitement par saignées : Oui Non Ne sait pas

Rythme des saignées :

2. Complications lithiasiques :

Lithiase vésiculaire : Oui Non Ne sait pas

Si oui, date du diagnostic : /_/_/ /_/_/ /_/_/_/_/

Lithiase Cholédocienne : Oui Non Ne sait pas

Cholecystite aigüe : Oui Non Ne sait pas

Angiocholite aigüe : Oui Non Ne sait pas

Pancréatite aigüe : Oui Non Ne sait pas

Cholecystectomie : Oui Non Ne sait pas

Date : /_/_/ /_/_/ /_/_/_/_/

Lithiase intra -hépatique : Oui Non Ne sait pas

Maladie de Gilbert : Oui Non Ne sait pas

3. Complications thrombotiques

Thromboses veineuses : Oui Non Ne sait pas

Historique :

.....
.....

Oedèmes des membres inférieurs : Oui Non Ne sait pas

Hypertension artérielle pulmonaire : Oui Non Ne sait pas

Thromboses artérielles : Oui Non Ne sait pas

Historique :

.....

Troubles de la microcirculation : Oui Non Ne sait pas

Ulcères des membres inférieurs : Oui Non Ne sait pas

Priapisme : Oui Non Ne sait pas

Autres facteurs de risque cardiovasculaires : Oui Non Ne sait pas

Anomalies constitutionnelles de thrombophilie : Oui Non Ne sait pas

Présence d'un ACC : Oui Non Ne sait pas

4. Anomalie de la saturation :

Oui Non Ne sait pas valeur :

5. Autres :

Autres signes cliniques :

Recherche de foyers d'hématopoïèse extra médullaire :

Prise en charge thérapeutique :
--

Traitement myelofreinateur : Oui Non Ne sait pas

Nom de la molécule :

Traitement anticoagulant / antiagrégant : Oui Non Ne sait pas

Historique :

Supplémentation en vitamine B9 : Oui Non Ne sait pas

Autres traitements :

Transfusions dépendant : Oui Non

Si oui, rythme des transfusions :

Transfusions accidentelles de culots globulaires :

Nombre total de transfusions :

Dates et indications

Etat du patient:

Vivant Décédé

Date du décès : /_/_/ /_/_/ /_/_/_/_/

Cause du décès :

Suivi par:

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Modell B. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. Bull World Health Organ. 1 juin 2008;2008(6):480-7.
2. Hb Var [Internet]. Disponible sur: <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>
3. Elion J. La Drépanocytose : Dossier Inserm.; Disponible sur: [https://www.academia.edu/23191275/La drépanocytose_Dossier_Inserm](https://www.academia.edu/23191275/La_drépanocytose_Dossier_Inserm)
4. Perutz MF, Rossmann MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North ACT. Structure of Hemoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5. Resolution, Obtained by X-Ray Analysis. Nature. 13 févr 1960;185(4711):416-22.
5. Marengo-Rowe AJ. Structure-function relations of human hemoglobins. Proc Bayl Univ Med Cent. juill 2006;19(3):239-45.
6. Leblanc B cours B 514. Biochimie des protéines. Université de Sherbrooke; 2013. Disponible sur: <http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/2d.html>.
7. L'Hématologie de Bernard Dreyfus 1992, Jeanine Breton-Gorius, Félix Reyes, Henri Rochart, Jean Rosa, Jean-Paul Vernant, Medecine-Sciences, Flammarion
8. Mihailescu M-R, Russu IM. A signature of the T \rightarrow R transition in human hemoglobin. Proc Natl Acad Sci. 27 mars 2001;98(7):3773-7.
9. Masson E. Hémoglobines : structure et fonction . EM-Consulte. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/35749/hemoglobines-structure-et-fonction>
10. Nelson, D.L. and Cox, M.M. Principles of Biochemistry, Fourth Edition (Freeman Publishers), New Yorkprincip. 2005
11. OXYGÉNOTHÉRAPIE EN ANESTHÉSIE OBSTÉTRICALE. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/242365391_OXYGENOTHERAPIE_EN_ANESTHESIE_OBSTETRICALE
12. Labie D, Elion J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de

l'hémoglobine. EMC - Hématologie. déc 2005;2(4):220-39.

13. D.Labie Inserm U15 Cochin, R Krishnamoorthy, Activation des gènes de l'hémoglobine au cours du développement, *Medecine-Sciences*,1988; 7 427-434
14. Couque N, Trawinski E, Elion J. Génétique des maladies de l'hémoglobine. *Rev Francoph Lab*. avr 2016;2016(481):49-60.
15. Grosveld F, van Assendelft GB, Greaves DR, Kollias G. Position-independent, high-level expression of the human β -globin gene in transgenic mice. *Cell*. 24 déc 1987;51(6):975-85.
16. Pasvol G. Protective hemoglobinopathies and *Plasmodium falciparum* transmission. *Nat Genet*. avr 2010;42(4):284-5.
17. Forget BG, Bunn HF. Classification of the Disorders of Hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1 févr 2013;3(2):a011684-a011684.
18. Pauling L, Itano HA. Sick cell anemia a molecular disease. *Science*. 25 nov 1949;110(2865):543-8.
19. Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sick cell haemoglobin. *Nature*. 17 août 1957;180(4581):326-8.
20. Elion J. La Drépanocytose : Dossier Inserm. Inserm - Génétique Génomique Bioinformatique Doss Inf Rédigé Par Simon Pierrefixe 2013; Disponible sur: https://www.academia.edu/23191275/La_Drépanocytose_Dossier_Inserm
21. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sick cell disease. *Lancet Lond Engl*. 11 déc 2010;376(9757):2018-31.
22. Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, et al. Evidence for the multicentric origin of the sick cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. mars 1984;81(6):1771-3.
23. Elion J. Physiopathologie de la drépanocytose [Pathophysiology of sick cell disease]. *MédecineTrop*https://www.academia.edu/5569819/Physiopathologie_de_la_drepanocytose_Pathophysiology_of_sick_cell_disease_

24. Parise LV, Berliner N. Sick cell disease: challenges and progress (Internet). Am Soc Hematology; 2016. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/content/127/7/789>.
25. Serjeant GR. The Natural History of Sick Cell Disease. Cold Spring Harb Perspect Med. 1 oct 2013;3(10):a011783.
26. Galacteros F, Bardakjian-Michau J, Roussey M, Suzan F, Paty A, De Montalembert M, Etienne M, Ioko G, Elenga N, Vaz T, Ruszlak M. La drépanocytose en France : des données épidémiologiques pour améliorer la prise en charge. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire-INVS; 2012.
27. Syndrome drépanocytaires majeurs de l'adulte- protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. HAS-ALD; 2010.
28. ROFSED - Réseau Francilien de Soins des Enfants Drépanocytaires [Internet]. ROFSED. [cité 29 juill 2017]. Disponible sur: <http://www.rofsed.fr>
29. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. N Engl J Med. 1995;332(20):1317–1322.
30. Kim K, Li J, Barazia A, Tseng A, Youn S-W, Abbadessa G, et al. ARQ 092, an orally-available, selective AKT inhibitor, attenuates neutrophil-platelet interactions in sickle cell disease. Haematologica. 1 févr 2017;102(2):246–59.
31. Vichinsky E. Hemoglobin E syndromes. ASH Educ Program Book. 2007;2007(1):79–83.
32. Fucharoen S, Weatherall DJ. The Hemoglobin E Thalassemias. Cold Spring Harb Perspect Med. 1 août 2012;2(8):a011734–a011734.
33. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. Nature. 16 sept 2010;467(7313):318–22.
34. Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simporé J, Verra F, Konaté A, et al. Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. Nature. 15 nov 2001;414(6861):305–8.

35. Nagel RL, Fabry ME, Steinberg MH. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Rev.* sept 2003;17(3):167-78.
36. Bachir Dora, Galacteros Frédéric. Hemoglobin C. Orphanet; 2004.
37. Couque N, De Montalembert M. Diagnostic d'une hémoglobinopathie. *Feuill Biol.* 2013;311:5-18.
38. Rund D, Rachmilewitz E. β -Thalassemia. *N Engl J Med.* 2005;353(11):1135-1146.
39. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* févr 2010;12(2):61-76.
40. Catherine Badens, laboratoire de génétique moléculaire, hôpital enfants de la Timone. Registre des patients thalassémiques en France (Registre qualifié). 2015.
41. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet.* avr 2001;2(4):245-55.
42. Joly P, Pondarre C, Badens C. Les bêta-thalassémies : aspects moléculaires, épidémiologiques, diagnostiques et cliniques. *Ann Biol Clin (Paris).* 1 nov 2014;72(6):639-68.
43. HAS-Guide affection longue durée Syndrome thalassémiques majeurs et intermédiaires- Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. 2008.
44. Dussiot M, Maciel TT, Fricot A, Chartier C, Negre O, Veiga J, et al. An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in β -thalassemia. *Nat Med.* avr 2014;20(4):398-407.
45. Piel FB, Weatherall DJ. The α -Thalasseмииs. Longo DL, éditeur. *N Engl J Med.* 13 nov 2014;371(20):1908-16.
46. Yi JS, Moertel CL, Baker KS. Homozygous α -Thalassemia Treated with Intrauterine Transfusions and Unrelated Donor Hematopoietic Cell Transplantation. *J Pediatr.* mai 2009;154(5):766-8.
47. Beaudry MA, Ferguson DJ, Pearse K, Yanofsky RA, Rubin EM, Kan YW. Survival of a hydropic infant with homozygous α -thalassemia-1. *J Pediatr.* 1986;108(5):713-716.

48. Origa R, Sollaino MC, Giagu N, Barella S, Campus S, Mandas C, et al. Clinical and molecular analysis of haemoglobin H disease in Sardinia: haematological, obstetric and cardiac aspects in patients with different genotypes. *Br J Haematol.* janv 2007;136(2):326-32.
49. Kanavakis E, Papassotiriou I, Karagiorga M, Vrettou C, Metaxotou-Mavrommati A, Stamoulakatou A, et al. Phenotypic and molecular diversity of haemoglobin H disease: a Greek experience. *Br J Haematol.* 1 déc 2000;111(3):915-23.
50. Efremov GD. Hemoglobins Lepore and anti-Lepore. *Hemoglobin.* 1978;2(3):197-233.
51. Ballin A, Brown EJ, Zipursky A. Idiopathic Heinz body hemolytic anemia in newborn infants. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1989;11(1):3-7.
52. Idiopathic Heinz Body Anaemia: Hb-Bristol (Beta67 (E11) Val to Asp) [Internet]. PubMed Journals.
53. Carrell RW, Lehmann H, Hutchison HE. Haemoglobin Köln (beta-98 valine->methionine): an unstable protein causing inclusion-body anaemia. *Nature.* 28 mai 1966;210(5039):915-6.
54. The unstable hemoglobins: Some genetic aspects. https://www.researchgate.net/publication/286732507_The_unstable_hemoglobins_Some_genetic_aspects
55. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin Variants: Biochemical Properties and Clinical Correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. mars 2013 [cité 3 août 2017];3(3). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3579210/>
56. Moo-Penn WF, Jue DL, Johnson MH, Olsen KW, Shih D, Jones RT, et al. Hemoglobin Brockton [beta 138 (H16) Ala. fwdarw. Pro]: an unstable variant near the C-terminus of the beta subunits with normal oxygen-binding properties. *Biochemistry (Mosc).* 1988;27(20):7614-7619.
57. Thein SL, Hesketh C, Taylor P, Temperley IJ, Hutchinson RM, Old JM, et al. Molecular basis for dominantly inherited inclusion body beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* mai 1990;87(10):3924-8.
58. Stamatoyannopoulos G, Woodson R, Papayannopoulou T, Heywood D, Kurachi S.

Inclusion-body beta-thalassemia trait. A form of beta thalassemia producing clinical manifestations in simple heterozygotes. *N Engl J Med.* 25 avr 1974;290(17):939-43.

59. McMullin MF. Diagnosis and management of congenital and idiopathic erythrocytosis. *Ther Adv Hematol.* 2012;3(6):391–398.

60. Cheminel V, Prevosto J-M, Dusseau J-Y, Martinez J-Y, Francina A, Crevon L. A propos d'un cas original de polyglobulie asymptomatique. *Ann Biol Clin (Paris).* 2000;58(5):627-9.

61. Charache S, Weatherall DJ, Clegg JB. Polycythemia associated with a hemoglobinopathy. *J Clin Invest.* 1966;45(6):813.

62. Clegg JB, Naughton MA, Weatherall DJ. Abnormal human haemoglobins: Separation and characterization of the α and β chains by chromatography, and the determination of two new variants, Hb Chesapeake and Hb J (Bangkok). *J Mol Biol.* 1966;19(1):91IN2–108.

63. Orvain C, Joly P, Pissard S, Badiou S, Badens C, Bonello-Palot N, et al. Évaluation de la démarche diagnostique des hémoglobines hyperaffines : expérience franco-belge et revue de la littérature. *Ann Biol Clin (Paris).* 1 janv 2017;75(1):39-51.

64. Mangin O. High oxygen affinity hemoglobins. *Rev Médecine Interne.* févr 2017;38(2):106-12.

65. Wajcman H, Galactéros F. Hemoglobins with High Oxygen Affinity Leading to Erythrocytosis. New Variants and New Concepts. *Hemoglobin.* 1 mai 2005;29(2):91-106.

66. Percy MJ, McFerran NV, Lappin TRJ. Disorders of oxidised haemoglobin. *Blood Rev.* mars 2005;19(2):61-8.

67. Blessum C, Jeppsson JO, Aguzzi F, Bernon H, Bienvenu J. L'électrophorèse capillaire : principe et applications au laboratoire de biologie clinique. *Ann Biol Clin (Paris).* 24 nov 1999;57(6):643-57.

68. Cotton F, Vertongen F, Gulbis B. Électrophorèse capillaire et hémoglobinopathies. *Immuno-Anal Biol Spéc.* févr 2006;21(1):45-50.

69. Tan GB, Aw TC, Dunstan RA, Lee SH. Evaluation of high performance liquid

chromatography for routine estimation of haemoglobins A2 and F. *J Clin Pathol.* sept 1993;46(9):852-6.

70. Merono F, Agouti I, Bonello-Palot N, Paolasso C, Levy N, Badens C. Analytical evaluation of the Tosoh HLC-723 G8 automated HPLC analyzer for hemoglobin analysis in beta-thalassemia mode. *Clin Biochem.* avr 2011;44(5-6):441-3.

71. Bardakdjian-Michau J, Dhondt J-L, Ducrocq R, Galactéros F, Guyard A, Huchet F-X, et al. Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. In: *Annales de Biologie Clinique* . 2003 p. 401-409.

72. Orvain C, Joly P, Pissard S, Badiou S, Badens C, Bonello-Palot N, et al. Évaluation de la démarche diagnostique des hémoglobines hyperaffines : expérience franco-belge et revue de la littérature. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1 janv 2017;75(1):39-51.

73. Huber FL, Latshang TD, Goede JS, Bloch KE. Does venous blood gas analysis provide accurate estimates of hemoglobin oxygen affinity *Ann Hematol.* avr 2013;92(4):517-21.

74. Carrell RW, Kay R. A simple method for the detection of unstable haemoglobins. *Br J Haematol.* 1972;23(5):615-619.

75. Gulbis B, Cotton F, Vertongen F. Hémoglobines anormales rares. *EMC - Hématologie*. 1 nov 2004;1(4):106-14.

76. Pearson TC, Guthrie DL, Simpson J, Chinn S, Barosi G, Ferrant A, et al. Interpretation of measured red cell mass and plasma volume in adults: Expert Panel on Radionuclides of the International Council for Standardization in Haematology. *Br J Haematol.* 1995;89(4):748-756.

77. Baklouti F, Giraud Y, Francina A, Richard G, Favre-Gilly J, Delaunay J. Hemoglobin Pierre-Bénite [beta 90(F6)Glu---->Asp], a new high affinity variant found in a French family. *Hemoglobin.* 1988;12(2):171-7.

78. Nute PE, Stamatoyannopoulos G, Hermodson MA, Roth D. Hemoglobinopathic Erythrocytosis due to a New Electrophoretically Silent Variant, Hemoglobin San Diego (β 109(G11)Val \rightarrow Met). *J Clin Invest.* 1 janv 1974;53(1):320-8.

79. Cheminel V, Prevosto J-M, Dusseau J-Y, Martinez J-Y, Francina A, Crevon L. A propos d'un cas original de polyglobulie asymptomatique. *Ann Biol Clin (Paris)*. 6 oct 2000;58(5):627-9.
80. Lie-Injo LE, Randhawa ZI, Ganesan J, Kane J, Peterson D. Hemoglobin Tak in a newborn Malay. *Hemoglobin*. 1977;1(8):747-757.
81. Perry MC, Head C, Fairbanks VF, Jones RT, Taylor H, Proud V. Hemoglobin Columbia Missouri or alpha 2[88 (F9) Ala-->Val]beta 2: a new high-oxygen-affinity hemoglobin that causes erythrocytosis. *Mayo Clin Proc*. janv 1991;66(1):5-10.
82. Boyer SH, Charache S, Fairbanks VF, Maldonado JE, Noyes A, Gayle EE. Hemoglobin Malmö β -97 (FG-4) Histidine→Glutamine: A Cause of Polycythemia. *J Clin Invest*. 1 mars 1972;51(3):666-76.
83. Esparcieux A, Francina A, Vital-Durand D. Polyglobulies : penser à rechercher une hémoglobine hyperaffine pour l'oxygène.
84. Wajcman H, Galacteros F. Abnormal hemoglobins with high oxygen affinity and erythrocytosis. *Hematol Cell Ther*. 1996;38(4):305-312.
85. Stamatoyannopoulos G, Nute PE, Adamson JW, Bellingham AJ, Funk D. Hemoglobin Olympia (β 20 Valine → Methionine): An Electrophoretically Silent Variant Associated with High Oxygen Affinity and Erythrocytosis. *J Clin Invest*. 1 févr 1973;52(2):342-9.
86. Loustau V, Guillaud C, Garcon L, Godeau B, Michel M. Anémie hémolytique chez l'adulte : principales causes et démarche diagnostique. *Presse Médicale*. mai 2011;40(5):470-85.
87. Opfell RW, Lorkin PA, Lehmann H. Hereditary non-spherocytic haemolytic anaemia with post-splenectomy inclusion bodies and pigmenturia caused by an unstable haemoglobin Santa Ana-beta-88 (F4) leucine--proline. *J Med Genet*. déc 1968;5(4):292-7.
88. Carrell RW, Lehmann H, Lorkin PA, Raik E, Hunter E. Haemoglobin sydney: Beta-67 (E11) valine modified to alanine: an emerging pattern of unstable haemoglobins. *Nature*. 5 août 1967;215(5101):626-8.
89. Gyan E, Darre S, Jude B, Cambier N, Demory JL, Bauters F, et al. Acute priapism in a

patient with unstable hemoglobin Perth and Factor V Leiden under effective oral anticoagulant therapy. *Hematol J Off J Eur Haematol Assoc.* 2001;2(3):210-1.

90. Rose C, Bauters F, Galacteros F. Hydroxyurea therapy in highly unstable hemoglobin carriers. *Blood.* 1 oct 1996;88(7):2807-8.

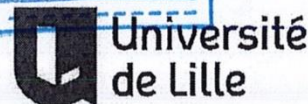
91. Li R, Wang T, Xie X-M, Li D-Z. Case report: prenatal diagnosis of Hb Hammersmith [β 42(CD1)Phe→Ser; HBB: c.128T>C] in a family with an adult male patient. *Hemoglobin.* 2014;38(2):142-5.

92. Tuohy AM, McKie VC, Sabio H, Kutlar F, Kutlar A, Wilson JB. Hb Hammersmith [β 42(CD1) Phe-->Ser]: occurrence as a de novo mutation in black monozygotic twins with multiple congenital anomalies. *J Pediatr Hematol Oncol.* déc 1998;20(6):563-6.



Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
: http://pharmacie.univ-lille2.fr/



DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : ...FASQUEL... Claire... INE : 09.02.011934.e

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 17/04/2018 à 18h...00 Amphithéâtre ou salle : ...Curie...

Avis du conseiller (directeur) de thèse

Nom : ...MÉREAU...

Prénom : Claude

- Favorable
- Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 19/3/2018

Signature: [Signature]

Avis du Président de Jury

Nom : ...Brousseau...

Prénom : Thierry

- Favorable
- Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 7 mars 2018

Signature: [Signature]

Décision de Monsieur le Doyen

- Favorable
- Défavorable

Le Doyen

[Signature]

D. DÉCAUDIN



NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(Tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2017/2018

Nom : FASQUEL
Prénom : Claire

Titre du mémoire / thèse :
Variants Instables et Hyperaffins de l'hémoglobine : étude rétrospective ; méthodes diagnostiques et impact clinique

Mots-clés :
Hémoglobinopathies, hémoglobine hyperaffine, hémoglobine instable

Résumé :

Les hémoglobinopathies représentent aujourd'hui un important problème de santé publique dans le monde mais également en France suite aux flux migratoires importants de ces dernières années. En dehors des syndromes drépanocytaires et thalassémiques majeurs, les autres variants symptomatiques de l'hémoglobine sont plus rares, de diagnostic plus difficile et peu étudiés.

Nous avons donc réalisé une rétrospective des moyens diagnostiques et des complications cliniques de tous les cas d'hémoglobines instables et hyperaffines identifiées ou suivies au laboratoire de Biochimie du Centre de Biologie Pathologie Génétique du CHRU de Lille depuis 1993, grâce notamment à des fiches de recueil de données pour chaque variant.

Les techniques de diagnostics utilisées par le laboratoire (Electrophorèse capillaire, CLHP, Isoélectrofocalisation) n'étaient informatives que dans 40% des cas (4 variants instables et 3 variants hyperaffins) montrant bien l'importance indispensable d'un séquençage moléculaire des gènes de l'hémoglobine en cas de suspicion.

Notre étude concernait un nombre peu important de patients (n=33) mais révélait un haut niveau de complications (19 patients sur 33 ont fait au moins une complication). L'objectif final de cette étude était de pouvoir améliorer le diagnostic, la prise en charge et le suivi de ces patients qui est pour le moment totalement empirique.

Membres du jury :

Président :

Pr Thierry Brousseau, PU-PH, Faculté de Pharmacie Lille 2

Assesseur(s) :

Dr Claude Mereau, MCU-PH, Faculté de Médecine Henri Warembourg, Lille 2

Pr Christian Rose, PU-PH, Université Catholique de Lille

Dr Patrice Maboudou, PH, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHRU Lille