

Diagnostic d'une hémoglobinopathie

N. COUQUE¹, M. DE MONTALEMBERT²

RÉSUMÉ

Les techniques actuelles d'étude de l'hémoglobine (Hb) permettent un diagnostic facile des principales hémoglobinopathies (anomalies qualitatives : HbS, HbC et HbE), ainsi que le diagnostic des bêta-thalassémies. Le diagnostic des pathologies associées à ces anomalies de l'hémoglobine est biologique, qu'il s'agisse des syndromes drépanocytaires majeurs, des syndromes bêta-thalassémiques ou de l'hémoglobinose H. Il est donc indispensable que le biologiste sache les reconnaître et qu'il puisse avoir à sa disposition l'ensemble des éléments cliniques, cytologiques et biochimiques nécessaires à l'interprétation des résultats.

MOTS-CLÉS : hémoglobinopathies, drépanocytose, thalassémie, HbS.

I. - INTRODUCTION

Dans la circulation périphérique, le globule rouge est une cellule anucléée dont la structure est adaptée à sa fonction essentielle, le transport et la libération de l'oxygène aux tissus. À l'état normal, le globule rouge présente la forme d'un disque biconcave. Sa déformabilité, assurée notamment par les propriétés de la membrane et la viscosité du contenu cellulaire, est un élément essentiel afin qu'il puisse délivrer l'oxygène dans les capillaires les plus fins au sein des tissus. Le globule rouge survit dans la circulation, d'une part, grâce à sa structure, qui lui permet de traverser rapidement le filtre splénique, et, d'autre part, grâce à la présence de systèmes enzymatiques qui lui assurent production d'énergie et lutte contre l'oxydation. L'hémoglobine est la protéine du globule rouge qui lui permet d'assurer sa fonction oxyphorique. Les pathologies constitutionnelles du globule rouge touchent les membranes, les systèmes enzymatiques et, enfin, l'hémoglobine.

II. - STRUCTURE DE L'HÉMOGLOBINE

Pour comprendre les maladies de l'hémoglobine, ou hémoglobinopathies, les notions essentielles sur la structure, la fonction et la synthèse de cette protéine doivent être connues.

L'hémoglobine est la protéine majeure du globule rouge. Elle a un rôle de transport de l'oxygène et est donc

essentielle à la vie. Il en existe différents types, dont l'expression évolue au cours du développement. Ces différentes hémoglobines sont des tétramères qui résultent de l'association de 4 chaînes polypeptidiques, dites chaînes de globine, semblables deux à deux. C'est la nature de ces chaînes qui va caractériser le type d'hémoglobine. Deux chaînes « α » (= ζ ou α) s'apparient systématiquement à deux chaînes « non α » (= ε , γ , δ ou β), permettant la production successive des différents types d'hémoglobine au cours du développement : durant la vie embryonnaire, les hémoglobines Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) et Portland ($\zeta_2\gamma_2$) ; durant la vie fœtale, l'hémoglobine principale est l'hémoglobine fœtale (HbF = $\alpha_2\gamma_2$) associée à l'hémoglobine A (HbA = $\alpha_2\beta_2$), dont l'expression augmente au fur et à mesure de la gestation ; chez l'adulte, l'hémoglobine principale est l'hémoglobine HbA associée à des hémoglobines dites minoritaires : les hémoglobines A2 (HbA2 = $\alpha_2\delta_2$) et HbF (Figure 1). Le profil d'expression des différentes hémoglobines permet de comprendre pourquoi les anomalies de la chaîne 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.

¹ CHU Robert Debré - Paris - Laboratoire de Génétique moléculaire et Biochimie.

² CHU Necker - Paris - Service de pédiatrie générale.

L'hémoglobine présente une structure primaire définie par la séquence en acides aminés des chaînes de globine, une structure secondaire (alternance d'hélices alpha et non-alpha), une structure tertiaire définie par l'arrangement tridimensionnel du monomère de globine qui permet de délimiter une poche à hème, et une structure quaternaire définie par les interactions entre les monomères au sein du tétramère. Les chaînes α et β sont assemblées entre elles par des liaisons fortes (liaisons $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_2$) et par des liaisons faibles (liaisons $\alpha_1\beta_2$ et $\alpha_2\beta_1$), les premières jouant un rôle essentiel dans la stabilité de la molécule et les secondes dans le processus de transition allostérique. En fonction de leur localisation, des mutations concernant des acides aminés impliqués dans les liaisons entre monomères sont responsables d'hémoglobines dites instables et/ou ayant une affinité modifiée pour l'oxygène (Figure 2).

III. - SYNTHÈSE DE L'HÉMOGLOBINE

Les différentes chaînes de globine sont codées par des gènes localisés sur deux « clusters » : le cluster alpha, localisé sur le chromosome 16, et le cluster bêta, localisé sur le chromosome 11 (Figure 3). Une molécule d'hémoglobine associe deux chaînes produites par des gènes localisés sur le chromosome 16 (chaînes ζ chez l'embryon, chaînes α chez le fœtus et l'adulte) et deux chaînes produites par des gènes situés sur le chromosome 11 (chaînes ϵ chez l'embryon ; chaînes γ chez l'embryon, le fœtus et le nouveau-né ; chaînes β – majoritairement – et chaînes δ chez l'enfant et l'adulte). Les gènes à l'origine de l'expression de l'HbA sont donc : les gènes alpha présents en 4 exemplaires (chaque gène est responsable de la synthèse d'environ 25 % des chaînes α) et les gènes bêta présents en 2 exemplaires (chaque gène est responsable de la synthèse d'environ 50 % des chaînes β) (1).

Pour rappel, un gène est une structure nucléotidique portant l'information génétique ; il est transcrit en ARNm qui, après maturation, pourra être traduit en une chaîne protéique avec une séquence en acides aminés bien définie. Pour être fonctionnel, un gène associe : un promoteur où se fixent les facteurs de transcription, un codon d'initiation de la traduction, des exons qui codent pour la séquence en acides aminés, des introns qui seront excisés lors de la maturation de l'ARNm, un codon de terminaison de la traduction encore appelé codon stop. Le contrôle de l'expression d'un gène est sous la dépendance du promoteur, mais aussi « d'enhancers » qui peuvent être localisés bien avant, bien après ou même à l'intérieur du gène. Dans le cas des gènes de globine, deux régions situées en amont de ces gènes contrôlent leur expression : le LCR (*Locus Control Region*) pour la famille β et le MCS-R (*Multispecies Conserved Sequences*) pour la famille α . De plus, des gènes localisés sur d'autres chromosomes, codant pour des facteurs trans-activateurs, influencent aussi l'expression des gènes de globines (exemple : gène ATRX, GATA1, BCL11A...) (2, 3, 4).

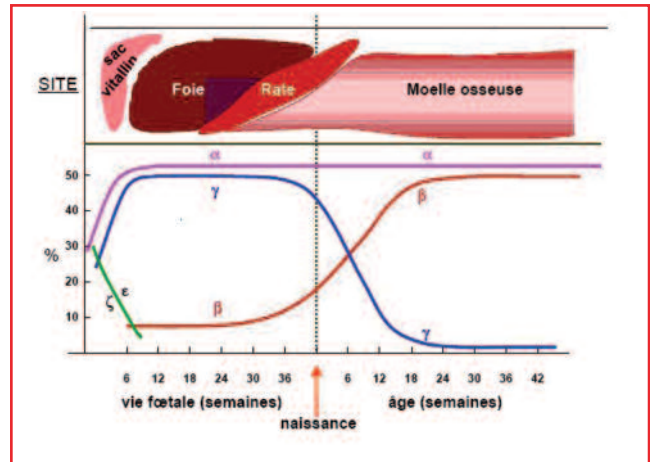


Fig. 1 - Expression des différentes hémoglobines au cours du développement.

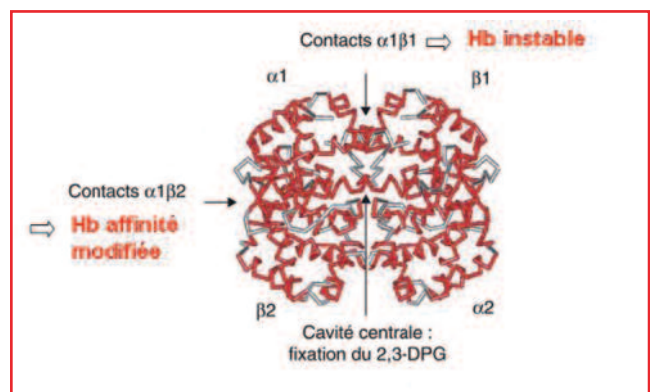


Fig. 2 - Représentation de la structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte (HbA) et de ses principales régions fonctionnelles. En rouge, sont indiquées les conséquences physiopathologiques de différents variants (adapté d'après (1)).

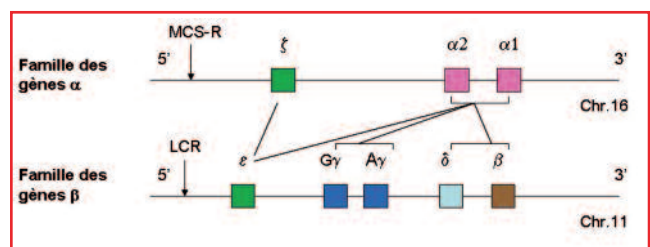


Fig. 3 - Structure et organisation des deux familles de gènes de globine.

IV. - FONCTION DE L'HÉMOGLOBINE

Chaque chaîne de globine possède une poche à hème qui permet à l'hémoglobine d'assurer sa fonction oxyphorique. En effet, chaque chaîne s'enroule sur elle-même en aménageant un repli central dans lequel se loge une molécule d'hème. L'hème s'arrime à la globine, et fixe un atome de fer, qui lui-même fixe une molécule d'oxygène. Ainsi, chaque molécule d'hémoglobine fixe 4 molécules d'oxygène et constitue l'oxyhémoglobine. La saturation en oxygène en fonction de la pression partielle d'oxygène se fait selon une courbe sigmoïde. On la caractérise souvent par la mesure de la P50 érythrocytaire, qui est la pres-

sion partielle de l'oxygène pour 50 % de saturation du sang. Au cours de la fixation ou de la libération d'oxygène, les sous-unités de l'hémoglobine subissent des mouvements faisant intervenir les liaisons faibles $\alpha_1\beta_2$ et $\alpha_2\beta_1$: elles se contractent à l'état oxygéné et se dilatent à l'état désoxygéné. Certaines mutations concernant les relations $\alpha_1\beta_2$ peuvent modifier l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène.

La poche centrale située entre les 4 sous-unités est occupée à l'état désoxygéné par le 2,3-DPG (2,3-diphosphoglycérate) qui, en se fixant entre les deux chaînes β , stabilise cette structure désoxygénée. Lors de l'oxygénation, cette poche se contracte et libère le 2,3-DPG. Le taux de 2,3-DPG intra-érythrocytaire règle l'affinité pour l'oxygène : son augmentation diminue l'affinité de l'Hb pour l'oxygène et, inversement, sa diminution augmente l'affinité pour l'oxygène. De même, une mutation de l'Hb qui diminue ou empêche la fixation du 2,3-DPG, entraîne une augmentation de l'affinité de l'Hb pour l'oxygène en déstabilisant la structure désoxygénée. Dans ce cas, la P50 érythrocytaire est basse (affinité augmentée) alors que le 2,3-DPG intra-érythrocytaire est normal. Aux pressions physiologiques d'oxygène, la distribution d'oxygène aux tissus est diminuée. Pour compenser, se développe une polyglobulie dont la sévérité est parallèle à l'augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Plus rarement, il existe des mutations diminuant l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. La P50 est alors élevée. Les patients ont une anémie et une cyanose, car le sang veineux est très désaturé. Des mutations concernant des acides aminés situés au niveau de l'interface « mobile » entre chaînes α et β lors de l'oxygénation (interface $\alpha_1\beta_2$) ou, plus rarement, la poche à hème, sont responsables d'hémoglobine hyper- ou hypo-affines pour l'oxygène.

V. - DÉFINITION DES HÉMOGLOBINOPATHIES

Les hémoglobinopathies sont classiquement séparées en deux grandes catégories :

- les variants de l'Hb avec anomalie qualitative : synthèse en quantité normale d'une hémoglobine « anormale » ;
- les variants de l'Hb avec anomalie quantitative : défaut quantitatif de production d'une hémoglobine normale, ce qui correspond à une thalassémie.

Quelques variants de l'Hb ont la particularité d'associer à la fois un défaut qualitatif et quantitatif.

Parmi les plus de 1 500 mutants répertoriés à ce jour (5), le rôle du laboratoire dans le diagnostic d'une hémoglobinopathie est de reconnaître le petit nombre de ceux qui sont cliniquement importants. En pratique, les anomalies qualitatives à connaître sont les hémoglobines S, C, D-Punjab, E, O-Arab et Lepore. Parallèlement à la reconnaissance de ces mutants d'intérêt, le diagnostic des thalassémies doit aussi être réalisé. Des cas plus rares peuvent se présenter, dont le diagnostic est également important

pour le patient : hémoglobines à affinité modifiée pour l'oxygène, hémoglobines instables et HbM.

VI. - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE D'UNE ANOMALIE DE L'HÉMOGLOBINE

Une anomalie de l'hémoglobine peut être recherchée devant des signes clinico-biologiques, le plus souvent une anémie (par extension devant une pâleur, un ictère, une hépato-splénomégalie, une asthénie, un essoufflement), plus rarement une cyanose ou une polyglobulie (par extension devant des céphalées, des acouphènes, des vertiges). Elle peut aussi être recherchée en raison de la constatation d'éléments purement biologiques comme une hémolyse ou une microcytose. Elle peut enfin être demandée lors d'une enquête familiale ou du dépistage systématique chez une personne appartenant à une ethnie dite « à risque » (Afrique sub-saharienne, Afrique du Nord, Bassin méditerranéen, Antilles, Asie, Moyen-Orient et Proche-Orient), ou encore dans un contexte anesthésique, anténatal, pré-greffe... Enfin, il peut s'agir d'un test de confirmation d'un dépistage néonatal.

Selon la NABM (nomenclature des actes de biologie médicale), « un bilan standard pour la recherche d'une hémoglobine anormale » doit inclure 3 tests phénotypiques distincts, dont au moins une technique électrophorétique avec interprétation (code I120). Les techniques utilisées sont, soit séparatives permettant de différencier les hémoglobines en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (électrophorèse et chromatographie), soit non séparatives, mais mettant en évidence des propriétés spécifiques : test Itano (ou test de précipitation de l'HbS), recherche de corps de Heinz, test de précipitation à l'isopropanol, spectrophotométrie pour la méthémoglobine, courbe de dissociation de l'oxygène,...

Les conditions pré-analytiques doivent être bien connues et maîtrisées. Le prélèvement de choix pour l'étude de l'hémoglobine est un échantillon sanguin recueilli sur EDTA. Le prélèvement doit être frais ou peut, à défaut, être conservé à +4°C pendant 1 semaine au maximum. L'interprétation des résultats nécessite un certain nombre de renseignements complémentaires : données hématologiques (résultat de la numération sanguine avec indices érythrocytaires voire analyse du frottis), bilan martial (au minimum la ferritine), notion éventuelle de transfusion...

A) Les techniques d'étude séparatives

1) L'électrophorèse

L'électrophorèse sépare les hémoglobines en fonction de leur différence de charge dans un champ électrique.

L'électrophorèse de zone à pH alcalin (pH = 8,6) sur support solide (acétate de cellulose ou agarose) est encore une technique largement utilisée. À pH alcalin, les hémoglobines sont chargées négativement et migrent vers l'anode (+). Si le variant de l'hémoglobine présente un

acide aminé de surface ayant un résidu qui modifie sa charge, soumis au champ électrique, il va être séparé de l'HbA. On parle de mutant « rapide » s'il est plus chargé négativement que l'HbA et donc migre plus près de l'anode que l'HbA, ou de mutant « lent » s'il est moins chargé négativement et donc migre moins près de l'anode que l'HbA. La coloration avec un colorant protéique (amidoschwarz ou rouge Ponceau) permet une meilleure visualisation des bandes. Cinq grands groupes se distinguent en fonction de leur migration électrophorétique : A, N, J, S et C. La séparation des principaux mutants d'intérêt à pH alcalin est représentée **figure 4**. Cette technique permet donc la séparation des principales hémoglobines : HbA, HbF, HbS/D/G et HbC/E/O-Arab. Elle est facile à mettre en œuvre, mais présente l'inconvénient de ne pas permettre une quantification fiable des fractions mineures et d'être peu résolutive.

L'électrophorèse à pH acide (pH = 6) sur support solide (citrate agar ou agarose) est une technique de seconde intention. Son principal avantage est qu'en complément de l'électrophorèse à pH alcalin, elle peut séparer l'HbS des mutants « S-like », et l'hémoglobine C (HbC) de l'hémoglobine E (HbE).

L'isoélectrofocalisation (IEF) consiste à établir un gradient de pH de 5 à 8 grâce à des ampholines, en gel d'agarose ou de polyacrylamide. Les différentes fractions d'hémoglobines soumises à un champ électrique migrent jusqu'au niveau du pH correspondant à leur point isoélectrique (pI), où elles s'immobiliseront puisque leur charge nette sera alors nulle. Cette technique sensible et résolutive permet de séparer un grand nombre de fractions d'hémoglobines différentes en fonction de leur pI. Elle ne requiert, de plus, qu'une faible quantité de prélèvement, si bien qu'elle est très utilisée pour le dépistage néonatal de la drépanocytose (**Figure 5**). Cependant, cette technique a un coût relativement élevé, n'est pas quantitative, et nécessite une certaine expertise.

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique d'électrophorèse liquide plus récemment développée pour l'étude de l'hémoglobine (6). Contrairement aux techniques citées ci-dessus, la migration se fait dans un capillaire de silice avec un tampon alcalin soumis à un haut voltage. Suite à l'injection de l'hémolysat dans le système et à l'application du courant électrique, les différentes fractions d'hémoglobines se séparent en fonction de leur mobilité électrophorétique (donc de leur charge) mais aussi en fonction du courant d'électro-endosmose (donc de leur rapport charge/masse). Les hauts voltages appli-

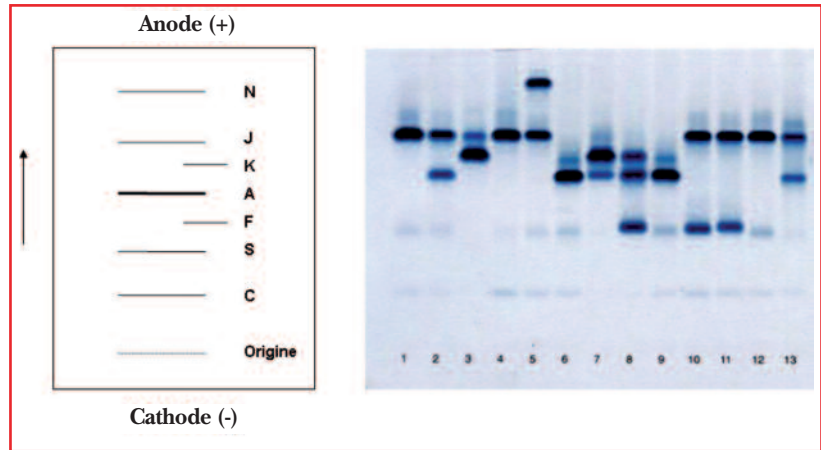


Fig. 4 - Analyse par électrophorèse à pH alcalin. Exemples de quelques anomalies de l'Hb (Hyragel Hemoglobin Sebia® ; pH = 8,5) : 1- HbA normale ; 2- hétérozygote HbA/HbS ; 3- nouveau-né avec trace d'Hb Bart's ; 4- hémoglobinose H ; 5- hétérozygote HbA/HbN-Baltimore ; 6- homozygote HbS ; 7- nouveau-né hétérozygote composite HbS/bêta+thalassémie ; 8- enfant hétérozygote composite HbS/HbC ; 9- hétérozygote composite HbS/ bêta°thalassémie ; 10- hétérozygote HbA/HbC ; 11- hétérozygote HbA/HbE ; 12- hétérozygote HbA/bêta-thalassémie ; 13-hétérozygote HbA/HbS-Antilles.

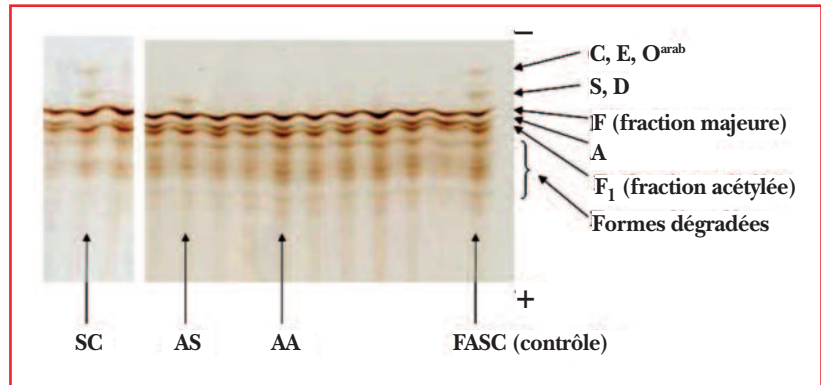


Fig. 5 - Analyse par isoélectrofocalisation : exemple du dépistage néonatal.

qués permettent une séparation rapide et sensible des différentes fractions. L'ordre de séparation est équivalent à celui observé pour l'électrophorèse sur gel à pH alcalin. La détection s'effectue par spectrophotométrie à 415 nm (maximum d'absorption de l'oxyhémoglobine). Un électrophorégramme est alors généré avec les différents fractions d'hémoglobines « normales » (HbA, HbF, HbA2) et les fractions « anormales » de mutants caractérisés de façon présomptive en fonction de leur position relative dans des zones spécifiques : HbS, HbC, HbE, HbO-Arab, HbD-Punjab... (7, 8). Une quantification relative des différentes fractions est réalisée. Cette technique présente l'avantage d'être automatisée, rapide, reproductible et quantitative, avec des tracés simples à interpréter.

2) La chromatographie

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) sépare les différentes fractions d'hémoglobines en fonction de la force de leurs interactions ioniques sur une colonne échangeuse de cations. Les molécules d'hémoglobine chargées positivement dans le tampon utilisé interagissent avec la colonne chargée négativement (résidu

carboxyl greffé sur une résine). 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. Les différentes fractions d'hémoglobines sont éluées à un temps donné qui est caractéristique : c'est le temps de rétention. La détection est spectrophotométrique et s'effectue à 415 nm. Les différents pics obtenus sont donc reconnus en fonction du temps de rétention : les hémoglobines normalement présentes (HbA, HbA₂, HbF), ainsi que les variants d'hémoglobine les plus fréquents, sont reconnus de façon présumptive, avec séparation des HbS, HbC, HbE, HbO-Arab, HbD-Punjab et G-Philadelphia ; les variants dont le temps de rétention n'est pas répertorié par le fournisseur sont dits « unknown » (Figure 6) (9, 10). À noter que dans la plupart des systèmes, l'HbE et l'Hb Lepore ne sont pas séparés de l'HbA₂. Une quantification des différentes fractions est réalisée par calcul de l'aire sous la courbe par rapport à l'aire total du chromatogramme. Pour certaines fractions (HbA₂, HbF), une quantification est établie par rapport à une calibration. Cette technique est automatisée, rapide, reproductible et quantitative. La validation des profils obtenus par CLPH repose sur un certain nombre de critères : ligne de base droite, aire totale dans les limites préconisées, temps de rétention attendus respectés (par rapport aux données fournisseur), pics bien symétriques, absence de contamination (présence d'extra-pics). Il faut aussi s'assurer que la quantification des contrôles de qualité interne est correcte.

D'autres techniques chromatographiques plus spécialisées peuvent être utilisées, notamment la chromatographie liquide en phase inverse. Elle sépare les différentes chaînes de globine en fonction de leur hydrophobicité, permettant la séparation de variants ayant la même charge (11). Elle indique aussi la chaîne de globine qui est anormale. Cette technique est réservée à des laboratoires spécialisés.

3) La spectrophotométrie de masse

Cette technique permet la séparation de différents fragments protéiques de masses différentes. La révélation d'une chaîne de globine avec une masse « anormale » et le calcul de la différence de masse permet d'en déduire l'acide aminé impliqué. Cette technique peut être couplée à des digestions enzymatiques préalables, qui permettent une précision plus importante (12).

4) Association de techniques séparatives et quantification

Aucune des techniques décrites ci-dessus ne présente de spécificité vis-à-vis du grand nombre de variants de l'hémoglobine décrits. L'association entre une technique électrophorétique et une technique CLHP est classique pour permettre l'identification présumptive des mutants les plus

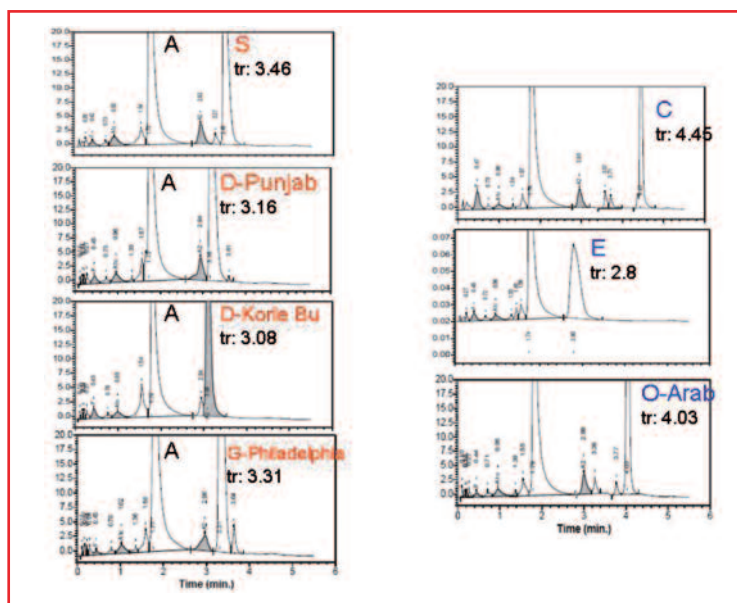


Fig. 6 - Exemples de profils en CLPH.

Les principaux variants du « groupe S-like » et du « groupe C-like » sont représentés (programme bêta-thal Bio-Rad®). Les temps de rétention (tr) en minutes sont donnés à titre indicatif.

fréquents. Il est indispensable de mettre en place un contrôle de qualité interne pour chaque technique utilisée, afin de s'assurer d'une identification fiable des hémoglobines normales ainsi que des mutants les plus fréquents.

Concernant la quantification des différentes fractions, seules les techniques CLHP et EC permettent une quantification fiable de la fraction d'HbA₂ qui, comme nous allons le préciser plus loin, est un élément diagnostique important. L'intégration densitométrique de profils électrophorétiques sur support solide ne doit plus être utilisée pour la quantification de l'HbA₂ (13). Un contrôle de qualité interne est indispensable pour s'assurer de la quantification. Pour l'interprétation, il faut se référer aux valeurs de référence établies par le laboratoire. À titre indicatif, nos valeurs de référence sont les suivantes : profil d'étude de l'hémoglobine d'un nouveau-né à terme : HbF = 70 à 85 %, HbA = 15 à 30 %, HbA₂ non quantifiable ; profil d'étude de l'hémoglobine d'un adulte : HbA majoritaire (80 à 97 %), HbA₂ = 2,0 à 3,4 %, HbF < 1 %. À noter que l'on considère qu'à l'âge de 1 an, le profil d'étude de l'hémoglobine de l'enfant est équivalent à celui de l'adulte (en dehors de l'HbF, qui peut persister à des taux < 5 % jusqu'à 2-3 ans). Compte tenu de la variabilité des valeurs de référence en fonction des techniques utilisées (14), la fédération internationale de chimie clinique (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, IFCC) a lancé un programme afin de développer un matériel de référence pour standardiser les tests (15).

B) Les techniques d'étude non séparatives

1) Test de solubilité de l'HbS

Le test Itano est essentiel pour confirmer la présence d'HbS et repose sur le principe que seule l'HbS désoxygénée

précipite en milieu réduit (16). C'est une technique manuelle facile à mettre en œuvre et rapide (< 10 minutes) mais qui utilise des réactifs « maison ». Son interprétation est facile à condition de prendre les précautions suivantes : travailler toujours par comparaison avec un échantillon témoin négatif (AA) et un échantillon témoin positif (AS) dans chaque série ; laver soigneusement le culot globulaire en sérum physiologique, afin d'éliminer tous les stromas cellulaires (risque de faux positifs) ; savoir qu'un taux d'HbS trop faible (< 20 %) peut donner un résultat faussement négatif (13).

Le test de falciformation de Emmel est une alternative au test Itano. C'est également une technique manuelle qui met en évidence les drépanocytes sur lame lorsque le frottis est mis en condition hypoxique. Elle nécessite plus de temps (45 minutes) et présente les mêmes risques de faux négatifs que le test Itano quand le taux d'HbS est trop faible.

2) Recherche d'inclusions d'HbH et recherche de corps de Heinz

L'hémoglobine H (HbH) (association de 4 chaînes β), retrouvée chez les patients atteints d'alpha-thalassémie avec plusieurs gènes non fonctionnels (2 et surtout 3), peut être mise en évidence après coloration supra-vitale par des colorants basophiles (bleu de crésyl brillant). De multiples granules ronds apparaissent colorés en gris-bleu et correspondent à la précipitation d'HbH, donnant un aspect de « balle de golf ». Les corps de Heinz (précipités d'hémoglobine dénaturée), qui apparaissent souvent « accrochés » au niveau de la membrane du globule rouge, sont mis en évidence avec cette même coloration et sont notamment présents en cas d'hémoglobine instable et dans les déficits en G6PD (17).

3) Autres tests

Tests de stabilité de l'Hb. Le test à l'isopropanol est le test de référence (18). Il doit être pratiqué sur un prélèvement frais (< 6 heures) et toujours en parallèle d'un témoin prélevé dans les mêmes conditions. Ce test peut s'avérer faussement négatif dans le cas d'hémoglobine hyper-instable.

Mesure de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène : étude fonctionnelle réservée à des laboratoires spécialisés dans un contexte d'hémoglobine ayant une affinité modifiée pour l'oxygène.

Analyse spectrophotométrique : mise en évidence des méthémoglobines et des HbM.

C) Place de la biologie moléculaire

La transmission des hémoglobinopathies se fait principalement selon un mode autosomique récessif. La caractérisation moléculaire est utile voire nécessaire pour le conseil génétique de couples à risque, pour affirmer ou simplement préciser le phénotype des cas index, de façon sporadique, pour caractériser des mutants (19). Le pré-

lable à toute analyse génétique est l'obtention du consentement écrit du patient (ou de ses parents pour un mineur), de l'attestation de consentement le cas échéant selon le décret n° 2008321 du 04 avril 2008. Les techniques utilisées sont des techniques de biologie moléculaire classiques : séquençage, dot-blot, gap-PCR, recherche de délétion par MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*),... (20).

VII. - INTERPRÉTATION D'UNE ÉTUDE DE L'HÉMOGLOBINE

Le diagnostic repose sur l'analyse des données fournies à partir d'une technique électrophorétique et d'une technique CLHP, association qui est classiquement utilisée par les laboratoires effectuant les tests diagnostiques d'hémoglobinopathies.

A) Hémoglobines anormales fréquentes et cliniquement significatives

Trois variants de la chaîne β , les premiers décrits dans la littérature, ont diffusé avec une grande fréquence épidémiologique et représentent des problèmes de santé publique. Ce sont les hémoglobines S, C et E qui, toutes trois, sont des variants de surface. Leur fréquence est en rapport, dans des régions anciennement impaludées, avec un processus de « polymorphisme équilibré » ayant entraîné une survie préférentielle sélective des hétérozygotes. Le deuxième facteur est l'endogamie, fréquente dans certaines des populations concernées.

1) HbS (*HBB :p.Glu6Val*) : l'hémoglobine de la drépanocytose

L'HbS est le mutant d'hémoglobine le plus fréquent. Sa répartition géographique initiale est l'Afrique - plus particulièrement l'Afrique sub-saharienne - mais aussi l'Inde et la péninsule Arabique. La répartition actuelle est mondiale et est le reflet des flux migratoires volontaires et forcés. Les sujets hétérozygotes pour ce mutant (β^A/β^S) sont porteur du trait drépanocytaire et asymptomatiques. La drépanocytose, transmise de façon autosomique récessive, est l'hémoglobinopathie grave la plus fréquente. La drépanocytose, et plus largement les syndromes drépanocytaires majeurs (SDM), englobent plusieurs associations génétiques qui sont responsables d'un tableau clinique commun en rapport avec les propriétés de l'HbS.

En effet, la physiopathologie des SDM résulte de la propriété de l'HbS désoxygénée à polymériser jusqu'à former des réseaux de fibres au sein du globule rouge. La polymérisation de l'HbS désoxygénée est responsable de déformations cellulaires typiques : les drépanocytes, ou hématies en « faucilles ». Ce phénomène de base entraîne les deux manifestations majeures de la maladie : l'anémie hémolytique par fragilisation des globules rouges, et la crise vaso-occlusive par obstruction des micro-capillaires. Le globule rouge est l'acteur principal mais l'environne-

ment cellulaire, aussi bien endothélial que circulant, est également un élément clé dans la physiopathologie de la maladie (1).

Sont considérés comme des SDM :

- l'HbS à l'état homozygote : β^S/β^S ;
- 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^o ou β^S/β^+ ;
- l'HbS associée à des variants spécifiques de l'hémoglobine chez des patients qui présentent aussi une hétérozygotie composite : β^S/β^C pour la plus fréquente, β^S/β^{O-Arab} , $\beta^S/\beta^{D-Punjab}$ et, plus rarement, β^S/β^E et β^S/β^{Lepore} (21).

Pour le laboratoire, le diagnostic de l'HbS est donc important. La présence en électrophorèse d'une bande dans la « S-Window » ou S-like, et en chromatographie d'un pic d'éluion compatible avec l'HbS, sont deux éléments présumptifs de la présence d'HbS. Compte tenu de l'existence de mutants présentant des propriétés équivalentes, une confirmation par un troisième test, classiquement le test Itano ou une électrophorèse en pH acide, est nécessaire (13, 19). L'association de ces 3 tests permet de distinguer facilement l'HbS des principaux mutants dits « S-like » en électrophorèse à pH alcalin : l'HbD-Punjab, l'HbG-Philadelphia, l'Hb Korle-Bu ou encore l'Hb Lepore. Une fois la présence d'HbS certaine, c'est le taux d'expression de l'HbS et les données clinico-biologiques qui vont permettre de conclure.

a) Présence d'HbS à un taux d'expression d'environ 35-40 % en association à de l'HbA

Ce profil est caractéristique du sujet hétérozygote β^A/β^S .

Cependant, quelques éléments doivent être connus avant de conclure définitivement. Tout d'abord, cette interprétation de l'hétérozygotie β^A/β^S n'est valable qu'en l'absence de transfusion récente (< 3 mois). Ensuite, le taux d'expression de l'HbS diminue dans deux situations fréquentes : une carence martiale et/ou un trait alpha-thalassémique associés. Dans ce dernier cas, plus le nombre de gène alpha atteints est grand, plus le taux d'expression de l'HbS est bas :

- HbS = 30 à 35 % si α^+ thalassémie hétérozygote (1 gène alpha délété : génotype $-\alpha/\alpha\alpha$) ;
- HbS = 25 à 30 % si α^+ thalassémie homozygote ou α^o thalassémie hétérozygote (2 gènes alpha délétés en trans $-\alpha/-\alpha$ ou en cis $-/\alpha\alpha$) ;
- HbS < 20 % dans les rares cas d'association entre une hétérozygotie β^A/β^S et une hémoglobinosose H ($-\alpha/-\alpha$) (22).

Un taux d'HbS diminué doit donc inciter à la recherche d'une éventuelle carence martiale (généralement associée à une anémie microcytaire) et évoquer un trait alpha-thalassémique (souvent associé à une microcytose).

Citons les rares cas des sujets qui sont diagnostiqués comme hétérozygotes β^A/β^S , mais qui sont symptoma-

tiques (anémie hémolytique régénérative en général compensée, ictère,...), ce qui nécessite dans ce contexte le recours aux techniques de biologie moléculaire afin de caractériser les rares doubles mutants qui présentent sur le même allèle la mutation β^S associée à une autre mutation du gène β qui favorise la polymérisation de l'Hb désoxygénée ; ces doubles mutants, dont le plus connu est l'HbS-Antilles, sont difficiles à caractériser sur le plan phénotypique (23).

b) Présence d'HbS à un taux d'expression HbS > 45 %

Ce profil est pathologique et s'accompagne souvent d'éléments cliniques (chez l'enfant de plus de 4 mois) : anémie hémolytique, crise douloureuse, ictère...

Plusieurs hypothèses diagnostiques sont possibles en fonction du profil observé.

Présence d'HbS, absence d'HbA, présence d'HbF à un taux variable.

Il s'agit d'un patient atteint d'un syndrome drépanocytaire majeur : homozygote β^S/β^S ou hétérozygote composite β^S/β^o thalassémique. Le diagnostic différentiel peut se faire facilement par l'analyse de l'étude de l'hémoglobine des parents ou par biologie moléculaire en cas d'impossibilité d'étude familiale complète. Le taux d'HbA2, classiquement augmenté de façon artéfactuelle en présence d'HbS en CLHP et modifié par l'association à une éventuelle α -thalassémie, est un mauvais marqueur diagnostique de l'hétérozygotie composite β^S/β^o thalassémie. La distinction entre homozygote β^S/β^S et hétérozygote composite β^S/β^o thalassémie ne modifie en rien la prise en charge médicale des sujets atteints, car la pathologie peut s'avérer aussi sévère dans un cas que dans l'autre. Cependant, cette distinction présente plusieurs intérêts : i) anticiper un éventuel futur diagnostic anté-natal ; ii) caractériser, le cas échéant, le défaut β^o thalassémique qui peut, en fonction de sa nature, expliquer une éventuelle modulation de l'expression clinique ; iii) faire connaître au patient le risque génétique pour sa descendance.

De façon plus rare, l'enquête familiale ou la biologie moléculaire peut mettre en évidence une hétérozygotie composite $\beta^S/PHHF$ « délétionnelle » (persistance héréditaire de l'HbF). Cette association est quasi asymptotique et s'accompagne de forts taux d'expression de l'HbF (> 30 %) ; à la différence des SDM, elle ne nécessite pas une prise en charge médicale spécifique. Vu les conséquences sur la prise en charge de l'enfant, cette association nécessite une confirmation au niveau moléculaire (24).

À noter que l'absence d'HbA ne peut pas être affirmée seulement à partir de techniques électrophorétiques. En effet, en CLHP, la présence de fractions d'HbS glyquées ou dégradées apparaît comme un petit double pic identifié comme de l'HbA. Il est important de s'assurer par une autre technique de la présence effective d'HbA, afin de ne pas conclure à tort « hétérozygote composite β^S/β^+ thalassémie » alors que la conclusion correcte est « homozygote β^S/β^S » ou « hétérozygote composite β^S/β^o ».

Présence d'HbS, présence d'HbA avec HbS > HbA, présence d'HbF à un taux variable.

Il peut s'agir :

- chez un patient récemment transfusé (< 3 mois), d'un patient atteint d'un SDM homozygote β^S/β^S ou hétérozygote composite β^S/β -thalassémie transfusé ;
- chez un patient non transfusé, d'un patient atteint d'un SDM hétérozygote composite β^S/β + thalassémique.

Afin de conclure, il est donc nécessaire dans cette situation de prendre contact avec le clinicien.

La caractérisation moléculaire des SDM de type β^S/β + thalassémique est recommandée afin de préciser le défaut β + thalassémique qui peut, en fonction de sa nature, expliquer une éventuelle modulation de l'expression clinique. Une classification clinique est ainsi proposée, en fonction du pourcentage d'HbA présent, qui dépend du défaut bêta-thalassémique : SDM sévère si HbA présente de 1 à 5 % ; SDM modéré si HbA présente de 6 à 15 % ; SDM peu sévère si HbA présente de 16 à 30 % (21).

Présence d'HbS, présence d'HbX, absence d'HbA, présence d'HbF à un taux variable.

Dans ces contextes d'hétérozygotie composite β^S/β^X , il est important de connaître les principales associations qui constituent un SDM car elles nécessitent une prise en charge médicale : hétérozygote composite β^S/β^C , β^S/β^{O-Arab} , $\beta^S/\beta^{D-Punjab}$, β^S/β^E , $\beta^S/\beta^{Leptore}$. En dehors de l'hétérozygotie composite β^S/β^C , facilement diagnostiquée sur le plan phénotypique, ces associations nécessitent une confirmation moléculaire.

HbF et SDM

Quel que soit le type de SDM, le taux d'HbF est toujours augmenté (> 1 % chez l'enfant de plus de un an). Le taux d'expression d'HbF est soumis à différents facteurs modulateurs : des facteurs génétiques présents sur le cluster bêta définissant les haplotypes et des facteurs dispersés sur le génome définissant des facteurs en *trans* plus récemment mis en évidence (4).

Schématiquement, pour les éléments les plus connus, le taux d'HbF est de : 5 à 7 % pour les haplotypes Bantu, Bénin et Cameroun ; 7 à 10 % pour l'haplotype Sénégal ; 10 à 25 % pour l'haplotype Arabo-Indien (25). Ces différents haplotypes ne permettent cependant pas d'expliquer en totalité la variabilité d'expression de l'HbF chez le drépanocytaire, suggérant le rôle d'autres facteurs modulateurs (26). L'utilisation de l'hydroxycarbamide, thérapeutique utilisée au cours des SDM, augmente l'HbF.

2) HbC (HBB :p.Glu6Lys)

C'est le deuxième variant de l'hémoglobine le plus fréquemment rencontré. Sa distribution géographique initiale a été celle du plateau voltaïque en Afrique de l'Ouest. La mutation affecte le sixième acide aminé de la chaîne bêta-globine - comme pour l'HbS - mais ne provoque pas

la formation de polymères. En revanche, 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. L'intérêt clinique du diagnostic de l'HbC est essentiellement en rapport avec le diagnostic de SDM que constitue l'association hétérozygote composite β^S/β^C .

La présence en électrophorèse d'une bande dans la « C-Window » ou C-like, et en chromatographie d'un pic d'élution compatible avec l'HbC, sont deux éléments présumptifs de la présence d'HbC. Ces associations sont nécessaires afin de distinguer facilement l'HbC des principaux mutants dit C-like en électrophorèse à pH alcalin : l'HbO-Arab et l'Hb E qui sont, en revanche, distincts en CLHP et en CE. Tout comme pour l'HbS, une fois la présence d'HbC certaine, c'est le taux d'expression et les données clinico-biologiques qui vont permettre de conclure.

a) Présence d'HbC à un taux d'expression d'environ 35 à 40 % en association à de l'HbA

Ce profil est caractéristique du sujet hétérozygote β^A/β^C . Tout comme pour l'HbS, cette interprétation n'est valable qu'en l'absence de transfusion récente (< 3 mois). Comme pour l'HbS également, le taux d'expression de l'HbC est diminué en cas de carence martiale et/ou d'alpha-thalassémie mineure. Contrairement à l'hétérozygotie β^A/β^S , qui ne présente aucune modification morphologique des globules rouges, le sujet hétérozygote β^A/β^C présente classiquement une discrète microcytose hyperchrome en rapport avec le phénomène de déshydratation, en l'absence de tout trait alpha-thalassémique associé.

b) Présence d'HbC, absence d'HbA, présence HbF à un taux variable

Ce profil est celui d'un patient atteint d'une hémoglobinopathie homozygote β^C/β^C ou plus rarement hétérozygote composite β^C/β^0 thalassémique. Le diagnostic différentiel peut se faire facilement par l'analyse de l'étude de l'hémoglobine des parents ou par biologie moléculaire en cas d'impossibilité d'étude familiale complète.

Les sujets homozygotes β^C/β^C présentent une discrète anémie hémolytique régénérative, en général bien compensée, une splénomégalie, un risque de carence en folates, un risque de lithiase biliaire et un risque d'érythroblastopénie due au Parvovirus B19 ; ils nécessitent un suivi médical. La forme β^C/β^0 thalassémique est plus symptomatique et peut s'apparenter dans les formes sévères au tableau d'une bêta-thalassémie intermédiaire (27).

c) Présence d'HbC, présence d'HbA avec HbC > HbA, présence d'HbF à un taux variable

En l'absence de transfusion récente (< 3 mois), ce profil est celui d'une hétérozygotie composite β^C/β -thalassémique. Sur le plan clinico-biologique, ces patients s'apparentent aux sujets homozygotes C.

d) Présence d'HbC, présence d'HbX, absence d'HbA, présence d'HbF à un taux variable

Dans le contexte d'une hétérozygotie composite β^S/β^X , il faut rechercher en priorité l'association β^C/β^S , qui constitue un SDM. Classiquement décrit comme moins sévère que les SDM de type homozygote β^S/β^S ou β^S/β^0 , ce SDM expose cependant à des complications qui peuvent être certes plus tardives, mais tout aussi sévères voire plus sévères : ostéonécrose de hanche, rétinopathie, atteinte auditive, syndrome thoracique aigu...

L'association de 3 techniques minimum permet facilement de diagnostiquer la présence d'HbS et d'HbC. D'autres associations plus rares peuvent être mises en évidence. Parmi elles, citons l'association $\beta^C/\beta^{\text{Korle-Bu}}$ qui présente la particularité d'être associée à une anémie microcytaire hémolytique modérée, l'Hb Korle Bu favorisant la cristallisation de l'HbC.

3) HbE (HBB :p.Glu26Lys)

Ce variant de l'hémoglobine est fréquent en Asie, tout particulièrement en Asie du Sud-Est (Laos, Cambodge, Thaïlande), dans le sud de la Chine et au nord du sous-continent Indien. La mutation ponctuelle à l'origine de ce variant présente une double propriété : d'une part, elle est responsable d'une substitution faux sens touchant le codon 26 de la chaîne bêta et créant un mutant de surface ; d'autre part, elle 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. La substitution n'affecte pas la fonction de l'hémoglobine, mais la diminution de l'ARNm normal conduit à un défaut de production et constitue donc un défaut bêta-thalassémique.

La présence en électrophorèse sur gel d'une bande dans la « C-Window » ou C-like, en CE d'un pic dans la zone d'identification de l'HbE, et en chromatographie d'un pic d'éluion compatible avec l'HbE (co-migration ou pic très proche de celui de l'HbA2), sont des éléments présomptifs de la présence d'HbE.

a) Présence d'HbE à un taux d'expression d'environ 30 à 35 % en association à de l'HbA.

Ce profil est caractéristique du sujet hétérozygote β^A/β^E .

Cependant, comme précédemment, cette interprétation n'est valable qu'en l'absence de transfusion récente (< 3 mois). Le taux d'expression de l'HbE est plus bas que celui des autres mutants bêta du fait de son caractère bêta-thalassémique (production de la chaîne β^E diminuée). Du fait de cette propriété bêta-thalassémique, les hématies des sujets hétérozygotes β^A/β^E sont discrètement microcytaires hypochromes avec quelques cellules cibles sur frottis. L'association d'une carence martiale et/ou d'un trait alpha-thalassémique voire d'une hémoglobinosose H, est responsable d'une diminution du taux d'expression de l'HbE. Au contraire, un taux d'HbE supérieur à 39 %, en dehors de toute transfusion, suggère une hétérozygotie composite β^E/β^+ thalassémique.

b) Présence d'HbE à un taux supérieur à 39 %

Ce profil est pathologique et peut correspondre à plusieurs hypothèses diagnostiques.

Présence d'HbE, absence d'HbA, présence d'HbF à un taux variable.

Comme pour les mutants de la chaîne β précédents, il peut s'agir d'une homozygotie β^E/β^E ou d'une hétérozygotie composite β^E/β^0 thalassémique. Comme précédemment, le diagnostic différentiel peut se faire facilement par l'analyse du phénotype des parents ou par biologie moléculaire en cas d'impossibilité d'étude familiale.

Les données clinico-biologiques sont très différentes entre ces deux hémoglobinopathies. Les sujets homozygote E sont asymptomatiques ; ils sont simplement microcytaires avec nombreuses cellules cibles au frottis mais pas, ou très modérément, anémiés avec un taux de réticulocytes normal, sans splénomégalie. Les sujets hétérozygotes composites β^E/β^0 thalassémiques sont beaucoup plus symptomatiques avec, cependant, une sévérité clinique très variable allant de la forme bêta-thalassémie intermédiaire à la bêta-thalassémie majeure « transfusions-dépendante » (27). La caractérisation moléculaire des défauts bêta-thalassémiques est recommandée afin d'anticiper un éventuel futur diagnostic anté-natal ; elle permet aussi de caractériser les défauts bêta-thalassémiques qui peuvent, en fonction de leur nature, expliquer une éventuelle modulation de l'expression clinique.

Présence d'HbE, présence d'HbA avec HbE > HbA, présence d'HbF à un taux variable.

Il peut s'agir :

- chez un patient récemment transfusé (< 3 mois), d'un patient homozygote β^E/β^E ou hétérozygote composite β^E/β -thalassémique ;
- chez un patient non transfusé, d'un patient hétérozygote composite β^E/β^+ thalassémique.

Afin de conclure, il est donc nécessaire de prendre contact avec le clinicien. La caractérisation moléculaire est recommandée afin de préciser le défaut β^+ thalassémique.

Présence d'HbE, présence d'HbX, absence d'HbA, présence d'HbF à un taux variable.

Dans ce contexte, il faut rechercher en priorité l'association β^S/β^E , qui constitue un SDM modéré, se comportant cliniquement comme une hétérozygotie composite β^S/β^+ thalassémique.

4) Autres mutants de l'Hb cliniquement significatifs

a) HbD Punjab (HBB :p.Glu121Gln)

Cette hémoglobinopathie est asymptomatique à l'état hétérozygote ou homozygote. Son importance clinique tient au fait que l'hétérozygotie composite $\beta^S/\beta^{\text{D-Punjab}}$ constitue un SDM sévère, l'HbD Punjab favorisant les propriétés de polymérisation de l'HbS. Ce variant est « S-like »

en électrophorèse sur gel à pH alcalin, mais distinct de l'HbS en CLHP, EC et IEF. Le diagnostic différentiel entre HbD et HbS est donc simple. Cependant, il existe de nombreuses HbD, et seule l'HbD Punjab constitue, en association avec l'HbS, une entité pathologique. Il est donc nécessaire chez les hétérozygotes composites, ou dans le contexte d'un conseil génétique, d'avoir recours à un laboratoire de référence pour le diagnostic de certitude.

b) HbO Arab (HBB :p.Glu121Lys)

Tout comme pour l'HbD Punjab, cette hémoglobino-pathie est asymptomatique à l'état hétérozygote ou homozygote. Son importance clinique tient au fait que l'hétérozygotie composite β^S/β^{O-Arab} constitue un SDM, l'HbO Arab favorisant les propriétés de polymérisation de l'HbS. Ce variant est « C-like » en électrophorèse sur gel à pH alcalin, mais distinct de l'HbC en CLHP, EC et IEF. Comme précédemment, le diagnostic de certitude chez un cas index ou dans un contexte de conseil génétique chez un couple à risque, nécessite le recours à un laboratoire de référence.

c) Hb Lepore

Cette hémoglobine résulte de l'expression d'un gène de fusion qui associe le promoteur du gène delta et une partie du gène bêta : c'est un hybride $\delta\beta$. Étant sous le contrôle du promoteur δ , il présente la particularité d'être faiblement exprimé (< 15 %), et s'apparente donc à un défaut bêta-thalassémique. Il devient cliniquement significatif lorsqu'on le retrouve associé à l'HbS, ce qui constitue un SDM, ou lorsqu'il est associé à un autre défaut bêta-thalassémique, ce qui constitue un syndrome bêta-thalassémique. La migration électrophorétique « S-like » sur gel, le temps de rétention proche de l'HbA2 en CLHP donnant des taux aberrants d'HbA2 > 8 % avec un épaulement caractéristique, le faible taux d'expression et la microcytose des hématies, constituent un faisceau d'argument pour faire un diagnostic présomptif d'Hb Lepore. Le recours à un laboratoire de référence est utile pour apporter un diagnostic de certitude.

B) Thalassémies

Les thalassémies sont un groupe hétérogène d'affections qui ont en point commun le défaut de synthèse, partiel ou total, d'une chaîne de globine. Ce déficit a pour conséquence un déséquilibre entre les chaînes, associé à un excès de chaînes non appariées responsable d'anomalies au niveau de l'érythropoïèse (28).

Nous ne parlerons ici que des bêta- et des alpha-thalassémies.

1) Bêta-thalassémies

Le terme bêta-thalassémie englobe trois formes cliniques différentes : la bêta-thalassémie majeure (TM) (ou anémie de Cooley), la bêta-thalassémie intermédiaire (TI) et la bêta-thalassémie mineure. Les deux premières formes se distinguent cliniquement par les besoins transfusionnels

Tableau I - Caractéristiques clinico-biologique des bêta-thalassémies.

	β -thalassémie majeure	β -thalassémie intermédiaire	β -thalassémie mineure
Sévérité	+++	++	0
Splénomégalie	+++	+ à +++	0 à +
Taux d'Hb	< 7	entre 7 et 10	> 10
Microcytose	+++	+ à +++	++
Érythroblastose	+++	+ à +++	0
Réticulocytes	+	++	Taux normal

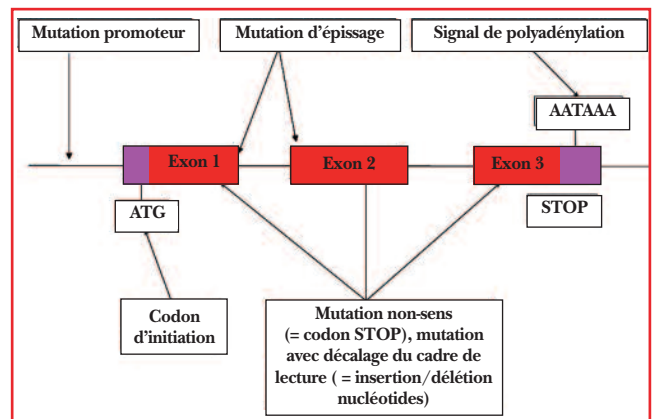


Fig. 7 - Mutations responsables de bêta-thalassémies (adapté d'après (1)).

du patient, les TM étant « transfusions-dépendantes » (Tableau I). En biologie, les TM et TI ne sont pas différenciées et sont désignées sous le terme de syndrome bêta-thalassémique. Endémique dans le bassin méditerranéen, la bêta-thalassémie est aussi très fréquente en Asie.

Les bêta-thalassémies ont été initialement classifiées de façon phénotypiques « β^+ » ou « β^0 » selon que les sujets homozygotes atteints produisaient ou non de l'HbA. Les progrès de la génétique ont permis de mettre en évidence la grande hétérogénéité des défauts et d'affiner la classification : 90 % des défauts sont des mutations ponctuelles, des micro-insertions ou des micro-délétions qui touchent l'ensemble du gène (promoteur, exons, introns...) (1).

Les différentes formes moléculaires sont rattachées à la classification initiale β^+ ou β^0 .

Les mutations β^0 , les plus sévères, touchent : i) les sites consensus d'épissage GT et AG ; ii) les mutations non-sens qui entraînent un arrêt de la traduction ; iii) les mutations par insertion ou délétion d'1 ou 2 nucléotides qui entraînent un décalage du cadre de lecture avec apparition d'un codon non-sens en aval ; iv) les rares mutations du codon d'initiation.

Les mutations β^+ touchent : i) le site promoteur ; ii) les séquences consensus entourant le site d'épissage ; iii) la région 5'UTR, les mutations créant des sites cryptiques d'épissage... (Figure 7).

Nous avons déjà cités au titre des hémoglobines anormales, l'HbE et l'Hb Lepore qui constituent aussi des mutants bêta+thalassémiques.

a) Bêta-thalassémie hétérozygote

Aussi connue sous le nom de trait bêta-thalassémique ou de bêta-thalassémie mineure, la bêta-thalassémie hétérozygote est responsable, du fait du défaut de synthèse de chaîne bêta, d'une microcytose avec pseudo-polyglobulie. Le taux d'hémoglobine est normal ou discrètement diminué.

Le diagnostic de trait bêta-thalassémique est biologique. Il est porté devant l'association d'une microcytose et de l'augmentation de l'HbA2 à l'étude de l'hémoglobine. Devant l'importance de la quantification de l'HbA2, dont les valeurs normales sont très proches des valeurs pathologiques, une technique analytique quantitative reproductible et précise doit nécessairement être utilisée (CLHP ou CE).

En l'absence de standard international, il faut se référer aux valeurs de référence de chaque laboratoire. Le seuil que nous utilisons est une HbA2 à 3,4 % : un taux d'HbA2 > 3,4 % (typiquement de 4 à 6 %, rarement en dehors de la fourchette 3,5 à 7 %) avec Hb > 10 g/dl et une microcytose (VGM < 80 fl) et/ou une hypochromie (TCMH < 27 pg), sont un faisceau d'arguments permettant de conclure à un trait bêta-thalassémique. Un taux d'HbA2 > 3,4 % mais avec une Hb < 10 g/dl, en l'absence de carence martiale, doit nuancer la conclusion entre un simple trait bêta-thalassémique et un syndrome bêta-thalassémique. Dans cette dernière éventualité, le taux d'HbF est en général augmenté (> 5 %) et l'analyse génétique permet de conclure. En revanche dans le cas du simple trait bêta-thalassémique, l'analyse moléculaire ne sera en général proposée que dans un contexte de conseil génétique. En effet, l'analyse phénotypique ne permet pas de distinguer un génotype hétérozygote β^A/β^0 ou β^A/β^+ , qui ne peuvent être diagnostiqués qu'au niveau moléculaire.

Plusieurs difficultés peuvent être rencontrées dans le diagnostic de trait bêta-thalassémique. D'une part, le diagnostic ne peut être fait que lorsque l'expression du gène delta est suffisante, et il ne peut donc pas être fait en période néonatale. D'autre part, on peut être confronté à des modifications de l'expression de l'HbA2 qui ne sont pas d'origine génétique :

- une augmentation de l'HbA2 > 3,4 %, en l'absence de microcytose, est observée en cas d'hyperthyroïdie, de carence en folates et/ou en vitamine B12, de traitement anti-rétroviraux ; si l'enquête étiologique est négative et que l'HbA2 reste augmentée, un trait bêta-thalassémique pourra être évoqué et confirmé par analyse moléculaire (rechercher notamment une association β -thalassémie hétérozygote et trait α -thalassémique *cf. infra*) ;
- une diminution de l'HbA2 de l'ordre de 0,5 % en moyenne est observée dans les carences martiales (29, 30), mais aussi dans les diabètes très déséquilibrés (31) ; ceci ne pose pas de problème diagnostique pour la plupart des défauts bêta-thalassémiques car le taux d'HbA2

reste suffisamment augmenté, mais cela peut normaliser un taux d'HbA2 dans le contexte de défauts bêta-thalassémiques où le taux d'HbA2 est « borderline ».

Des difficultés peuvent être aussi être dues aux interactions de génotypes :

- la présence à l'état hétérozygote d'un mutant de la chaîne delta implique 2 formes d'HbA2 : $\alpha\delta\delta$ (forme normale) + $\alpha\delta'\delta$ (forme mutée) ; si le mutant delta est quantifiable, il est indispensable d'ajouter les 2 formes d'HbA2 avant de conclure ; si le mutant delta n'est pas quantifiable, car non détectable chez un sujet porteur de trait bêta-thalassémique, donc microcytaire, le taux d'HbA2 sera « faussement » normal et la conclusion sera à tort « sujet porteur d'un trait alpha-thalassémique » (microcytose sans carence martiale avec taux d'HbA2 normal) ;
- la présence à l'état hétérozygote d'une delta-thalassémie pose les mêmes problèmes diagnostiques que le mutant de la chaîne delta hétérozygote non détectable ;
- la présence d'un trait bêta-thalassémique associé à un trait alpha-thalassémique : le ratio entre les chaînes alpha et bêta aura tendance à se normaliser, avec pour conséquence un VGM et une TCMH se rapprochant de la normale ; le taux d'HbA2 reste cependant augmenté ;
- la présence à l'état hétérozygote d'un mutant alpha implique 2 formes d'HbA2 - $\alpha\delta\delta$ (forme normale) + $\alpha'\delta\delta$ (forme mutée) - qui doivent être additionnées pour conclure ; si la fraction mutée n'est pas visible et que la fraction normale est < 3,4 %, le diagnostic de trait bêta-thalassémique ne peut être porté.

Enfin, le diagnostic peut être difficile en rapport avec des génotypes atypiques de bêta-thalassémie :

- plusieurs défauts moléculaires peu sévères peuvent rendre le diagnostic de bêta-thalassémie hétérozygote difficile car le taux d'HbA2 est normal ou « borderline » et la microcytose absente ou très modérée ; ce sont des sujets porteurs de bêta-thalassémie hétérozygote « silencieuse » qui sont le plus souvent diagnostiqués de façon rétrospective chez des parents d'enfants atteints de syndrome bêta-thalassémique ;
- deux formes plus rares de bêta-thalassémie, l' $\epsilon\gamma\delta\beta$ -thalassémie et la $\delta\beta$ -thalassémie, nécessitent le recours à la biologie moléculaire pour être diagnostiquées ; l' $\epsilon\gamma\delta\beta$ -thalassémie, due à de larges délétions au niveau du cluster bêta, est responsable d'anémie néonatale voire anténatale et d'une importante microcytose avec un profil d'étude de l'hémoglobine normal (taux d'HbA2 et d'HbF normaux) ; dans le cas de la $\delta\beta$ -thalassémie, due également à des délétions au niveau du cluster bêta, le taux d'HbA2 est bas ou à la limite inférieure de la normale mais le taux d'HbF est augmenté (de 5 à 15 % en général) et il existe une microcytose ; dans ce dernier cas, il est indispensable de faire le diagnostic différentiel avec une PHHF (HbA2 normale et HbF augmentée de 15 à 30 %).

Dans ces contextes de diagnostic difficile, s'il s'agit de patients vus en conseil génétique ou de parents d'enfants atteints, seule la biologie moléculaire permettra de conclure.

Parfois, la bêta-thalassémie hétérozygote peut être aussi symptomatique qu'une bêta-thalassémie intermédiaire, voire majeure, si elle est associée à un défaut du nombre de gène alpha (triplication par exemple), ce qui aggrave le déséquilibre entre les chaînes de globine, et donc l'expression clinique.

À noter que de nombreux mutants de la chaîne bêta de l'hémoglobine peuvent perturber la quantification de l'HbA2 car ils sont élués ou co-migrent avec l'HbA2 ou très proche de l'HbA2, les plus fréquents étant l'HbS, l'HbE, l'Hb Korle-bu, et l'HbO-Arab (variable en fonction des techniques). Ceci ne constitue cependant pas un problème diagnostique dans la mesure où la présence d'HbA associée à un mutant bêta exprimé à 35-45 % atteste de la fonctionnalité des 2 gènes bêta et donc de l'absence de bêta-thalassémie (32). De façon similaire, des mutants alpha de l'hémoglobine ou des mutants hybrides peuvent co-migrer avec l'HbA2, et ils seront à rechercher systématiquement dès lors que l'HbA2 est > 8 %.

b) Syndrome bêta-thalassémique

Le diagnostic de syndrome bêta-thalassémique est évoqué sur des arguments cliniques ou effectué à un stade pré-symptomatique dans le cadre d'un bilan familial ou, plus souvent à la naissance, à l'occasion du dépistage de la drépanocytose, qui permet également de diagnostiquer la majorité des bêta-thalassémies majeures. Il n'y a pas d'anémie à la naissance. Les enfants sont dépistés en période néonatale sur l'absence d'HbA et sont suivis à partir de l'âge de 3 mois afin d'observer l'apparition de l'anémie et d'évaluer sa sévérité. Le diagnostic clinique de bêta-thalassémie majeure est généralement porté entre 6 et 24 mois de vie devant une anémie microcytaire sévère (en général : Hb < 7 g/dl, VGM entre 50 et 70 fl, TCMH entre 12 et 20 pg), avec hépato-splénomégalie et parfois ictère. Le mécanisme principal de l'anémie est la dysérythropoïèse par destruction des érythroblastes médullaires, l'hémolyse périphérique étant secondaire. Le diagnostic dans les formes de gravité intermédiaire est plus tardif, en règle générale après l'âge de 4 ans.

Le diagnostic de bêta-thalassémie est biologique. Le frottis sanguin montre des hématies microcytaires et hypochromes, une anisocytose, une poïkylocytose, des hématies à ponctuations basophiles, des érythroblastes circulants (17). Le taux de réticulocytes est bas par rapport au degré d'anémie. L'étude de l'hémoglobine doit être pratiquée avant toute transfusion. Elle confirme le diagnostic en retrouvant une HbA absente ou en faible quantité et une forte élévation de l'HbF, à interpréter en fonction de l'âge du patient. L'hémogramme et l'étude de l'hémoglobine effectués chez les deux parents confirment leur statut hétérozygote, le syndrome bêta-thalassémique étant une maladie génétique autosomique récessive.

Tableau II - Caractéristiques clinico-biologiques des alpha-thalassémies.

Génotype	Phénotype	HbBart's (γ4)	Données hématologiques
$\alpha\alpha/\alpha$ (α^+ thalassémie hétérozygote)	Porteur silencieux	1 à 4 % à la naissance	Discrète microcytose VGM = 75-85 fl
$-\alpha/\alpha$ (α^+ thalassémie homozygote)	Trait alpha-thalassémique	Environ 10 % à la naissance	Discrète anémie Hb = 11-13 g/dl Microcytose VGM = 65-75 fl
$\alpha\alpha/-$ (α^0 thalassémie hétérozygote)		Environ 20 à 40 % à la naissance Puis HbH ($\beta 4$) : 3 à 30 %	Anémie microcytaire régénérative
$-/-$	<i>Hydrops foetalis</i>	100 %	Létal

Le diagnostic différentiel des syndromes bêta-thalassémiques comprend les PHHF homozygotes et les associations hétérozygotes composites β^0 /PHHF, qui sont cliniquement asymptomatiques avec absence d'anémie et de microcytose franche. La biologie moléculaire est indispensable pour le diagnostic de certitude.

2) Alpha-thalassémies

Deux éléments physiologiques permettent de comprendre la pathologie de type alpha-thalassémique : d'une part, sur chaque allèle, il existe 2 gènes α (gène dupliqué), un individu normal possédant donc 4 copies de gènes α ; d'autre part, les gènes alpha sont normalement exprimés dès la vie fœtale. L'inactivation du gène alpha est responsable de la formation de tétramères $\gamma 4$ (Hb Bart's), visibles uniquement en anté- et néonatal lorsque l'expression des gènes γ est prédominante, et ensuite de la formation de tétramères $\beta 4$ (HbH) lorsque l'expression des gènes β devient majoritaire. Ces tétramères sont solubles, inaptes à la transition allostérique et donc à la fonction oxyphorique, et responsables, non pas d'une érythropoïèse inefficace comme dans les bêta-thalassémies, mais d'une destruction périphérique de cellules matures (1). Pour chaque allèle, l'expression d'un seul gène α est une α^+ thalassémie et l'absence d'expression des 2 gènes est une α^0 thalassémie.

Schématiquement, il existe une corrélation entre le génotype et le phénotype (Tableau II).

L'inactivation d'un seul gène α est responsable de trait alpha-thalassémique associé à une microcytose et/ou une hypochromie très modérées (VGM < 80 fl, TCMH entre 25 et 28 pg), qui peuvent être absentes dans 1/3 des cas (30).

L'inactivation de deux gènes α est responsable de trait alpha-thalassémique associé à une microcytose et/ou une hypochromie modérées (VGM < 80 fl, TCMH < 25 pg). Dans les deux cas (1 ou 2 gènes α inactivés), l'étude de l'hémoglobine, en dehors de la période néonatale qui permet de mettre en évidence l'Hb Bart's, est normale, et le diagnostic ne sera que présomptif devant une microcytose et/

ou une hypochromie sans carence martiale avec dosage d'HbA2 normal. Il peut être cliniquement important de distinguer les deux cas d'inactivation de 2 gènes α : les sujets homozygotes α^+ (2 gènes inactivés en *trans*) ne présentent, en effet, aucun risque génétique, alors que les sujets hétérozygotes α^0 (2 gènes inactivés en *cis*) présentent le risque d'avoir un enfant sans aucun gène alpha, avec un risque de mort fœtale ou néonatale précoce. La confirmation moléculaire doit donc être proposée dans le contexte de conseil génétique ou chez les parents d'enfants atteints.

La non-expression de 3 gènes alpha se traduit cliniquement par l'hémoglobinose H : une anémie microcytaire régénérative avec poikilocytose marquée. Le diagnostic est porté par l'étude de l'hémoglobine, qui met en évidence l'HbH associée à une diminution du taux d'HbA2.

La non-expression des 4 gènes α est létale, avec anasarque fœto-placentaire dès la période périnatale (*hydrops fetalis*). Les défauts moléculaires sont majoritairement de type délétionnels. Des mutations peuvent aussi être mises en évidence : citons le mutant le plus fréquent, l'Hb Constant Spring, où une mutation du codon stop est responsable d'une chaîne alpha allongée instable, visible sous la forme de fractions faiblement exprimées et de migration plus lente que l'HbA2 (28).

C) Hémoglobinopathies rares

Certains mutants de l'hémoglobine, bien que présents à l'état hétérozygote, peuvent être responsables de manifestations cliniques. Une anémie hémolytique est ainsi classiquement observée dans les cas d'hémoglobines instables,

qui doivent être recherchées spécifiquement par un test de stabilité. La recherche de corps de Heinz constitue aussi, dans ce contexte, un élément d'orientation. La confirmation diagnostique ne pourra être faite que par biologie moléculaire. Le diagnostic d'une hémoglobine à affinité modifiée pour l'oxygène est demandé dans un contexte de polyglobulie (affinité augmentée) ou de cyanose (affinité diminuée). Il peut se faire sur le plan phénotypique par l'étude de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine et calcul de la p50 sur automate à gaz du sang. Compte tenu de la difficulté d'analyse de la courbe de dissociation (2 automates en France avec nécessité d'étude sur prélèvement frais < 2 heures), il est préconisé de séquencer les gènes afin de rechercher un éventuel variant.

VIII. - CONCLUSION

Le laboratoire effectuant le diagnostic des hémoglobinopathies doit savoir reconnaître les principaux mutants d'intérêt clinique, faire le diagnostic de bêta-thalassémie et d'alpha-thalassémie. Les difficultés tiennent, d'une part, au nombre de mutants et à la nécessaire confrontation de diverses techniques (2 ou 3 minimum) et, d'autre part, à l'intrication possible des anomalies. Au final, le diagnostic des hémoglobinopathies nécessite impérativement la confrontation de l'étude de l'hémoglobine proprement dite, des données cytologiques et des données cliniques pour une interprétation correcte des résultats. À la moindre incertitude diagnostique, l'avis d'un laboratoire de référence doit être sollicité.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Labie D, Elion J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Hématologie*. Paris : Elsevier, 2005.
- (2) Gibbons R. Alpha thalassaemia-mental retardation, X linked. *Orphanet J Rare Dis* 2006 ; 1 : 15.
- (3) Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 1992 ; 80 : 575-81.
- (4) Galarmeau G, Palmer CD, Sankaran VG, Orkin SH, Hirschhorn JN, Lettre G. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nat Genet*. 2010 ; 42 (12) : 1049-51.
- (5) HbVar: <http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>
- (6) Cotton F, Lin C, Fontaine B, Gulbis B, Janssens J, Vertongen F. Evaluation of a capillary electrophoresis method for routine determination of hemoglobins A2 and F. *Clin Chem* 1999 ; 45 (2) : 237-43.
- (7) Cotton F, Malaviolle X, Vertongen F, Gulbis B. Evaluation of an automated capillary electrophoresis system in the screening for hemoglobinopathies. *Clin Lab* 2009 ; 55 (5-6) : 217-21.
- (8) Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, Ou CN, Bak R. Comparison of Sebia Capillars capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol* 2008 ; 130 (5) : 824-31.
- (9) Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Nardi MA. HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 60000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clin Chem* 2004 ; 50 (10) : 1736-47.
- (10) Riou J, Godart C, Mathis M, Hurtrel D, Wajcman H, Préhu C, Bardakdjian J. Evaluation of the Bio-Rad VARIANT II HbA2/HbA1C Dual Program for measurement of hemoglobin concentrations and detection of variants. *Clin Chem Lab Med* 2005 ; 43 (2) : 237-43.
- (11) Wajcman H, Riou J. Globin chain analysis: an important tool in phenotype study of hemoglobin disorders. *Clin Biochem* 2009 ; 42 (18) : 1802-6.
- (12) Zanella-Cleon I, Préhu C, Joly P, Riou J, Becchi M, Wajcman H, Francina A. Strategy for identification by mass spectrometry of a new human hemoglobin variant with two mutations in *Cis* in the beta-globin chain: Hb S-Clichy [beta6(A3)Glu->Val; beta8(A5)Lys->Thr]. *Hemoglobin* 2009 ; 33 (3) : 177-87.
- (13) Bardakdjian-Michau J, Dhondt JL, Ducrocq R, Galactéros F, Guyard A, Huchet FX, Lahary A, Lenar-Russo D, Maboudou P, North ML, Prehu C, Soummer AM, Vershelde M, Wajcman H. Groupe de travail SFBC Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. *Ann Biol Clin (Paris)* 2003 ; 61 (4) : 401-9.
- (14) Paleari R, Gulbis B, Cotton F, Mosca A. Interlaboratory comparison of current high-performance methods for HbA(2). *Int J Lab Hematol* 2012 ; 34 (4) : 362-8.

- (15) Paleari R, Muñoz A, Mosca A. IFCC Working Group on Standardization of HbA2 (WG-HbA21). Towards the development of a certified reference material for hemoglobin A2. *Clin Chem Lab Med* 2010 ; **48** (11) : 1611-8.
- (16) Itano HA. Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobin. *Arch Biochem Biophys* 1953 ; **47** (1) : 148-59.
- (17) Aspect cytologique normal et pathologique du sang chez le nouveau-né et le jeune enfant. *Ann Biol Clin* (Paris) 2006 ; **64** (1) : 17-36.
- (18) Carrell RW, Kay R. A simple method for the detection of unstable haemoglobins. *Br J Haematol* 1972 ; **23** (5) : 615-9.
- (19) Aguilar-Martinez P, Badens C, Bonello-Palot N, Cadet E, Couque N, Ducrocq R, Elion J, Francina A, Joly P, Pissard S, Rochette J. Réseau DHOS Pathologie héréditaire de l'érythrocyte. Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. *Ann Biol Clin* (Paris) 2010 ; **68** (4) : 455-64.
- (20) Old JM. Methods for analysis of prenatal diagnosis. *Methods Mol Med* 2003 ; **82** : 117-31.
- (21) Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010 ; **376** (9757) : 2018-31.
- (22) Higgs DR. Molecular mechanisms of thalassemia. In : Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, eds. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management. Cambridge : Cambridge University Press, 2001 : 405-30.
- (23) Monplaisir N, Merault G, Poyart C, Rhoda MD, Craescu C, Vidaud M, Galacteros F, Blouquit Y, Rosa J. Hemoglobin S Antilles: a variant with lower solubility than hemoglobin S and producing sickle cell disease in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; **83** (24) : 9363-7.
- (24) Ngo DA, Aygun B, Akinsheye I, Hankins JS, Bhan I, Luo HY, Steinberg MH, Chui DH. Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletion hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Br J Haematol* 2012 ; **156** (2) : 259-64.
- (25) Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhdja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, Labie D. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; **81** (6) : 1771-3.
- (26) Chang YP, Maier-Redelsperger M, Smith KD, Contu L, Ducroco R, de Montalembert M, Belloy M, Elion J, Dover GJ, Girot R. The relative importance of the X-linked FCP locus and beta-globin haplotypes in determining haemoglobin F levels: a study of SS patients homozygous for beta S haplotypes. *Br J Haematol* 1997 ; **96** (4) : 806-14.
- (27) Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010 ; **5** : 11.
- (28) Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010 ; **5** : 13.
- (29) Galanello R, Ruggeri R, Addis M, Paglietti E, Cao A. Hemoglobin A2 in iron deficient beta-thalassemia heterozygotes. *Hemoglobin* 1981 ; **5** (6) : 613-8.
- (30) Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, Roper D, Rees DC, de La Salle B, Streeby A. British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol* 2010 ; **149** (1) : 35-49.
- (31) Couque N, Gautier JF, Devernay M, Trawinski E, Elion J, Ducrocq R. Sous-estimation de l'HbA2 chez un patient diabétique très mal équilibré : un piège dans le diagnostic d'un trait β -thalassémique. Communication affichée SFH 2009.
- (32) Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, Chan V, Fucharoen S, Giordano PC, Hoyer JD, Mosca A, Wild B. International Council for the Standardisation of Haematology (ICSH). ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin A2. *Int J Lab Hematol* 2012 ; **34** (1) : 1-13.