

Diagnostic et dépistage de la drépanocytose

La prévention des complications graves de la drépanocytose impose le dépistage de la maladie dès la naissance chez les sujets africains, antillais et maghrébins. Dans ces populations, le dépistage doit être également proposé aux sujets jeunes afin d'identifier, en vue d'un éventuel conseil génétique, les couples ayant un risque d'avoir des enfants atteints d'un syndrome drépanocytaire majeur.

Henri Wajcman*

L'hémoglobine (Hb)S est aujourd'hui la plus fréquente des anomalies génétiques en France. Il faut distinguer les formes hétérozygotes (HbA/HbS), habituellement silencieuses, des formes homozygotes (HbS/HbS) ou hétérozygotes composites (essentiellement HbS/ β thal, HbS/HbD-Punjab, HbS/HbC ou HbS/HbO-Arab) qui sont responsables de syndromes drépanocytaires majeurs, toujours graves sur le plan clinique et hématologique.¹

Comme le pronostic d'un syndrome drépanocytaire majeur est d'autant plus favorable que sa prise en charge est précoce, il est impératif d'en effectuer le diagnostic dès la naissance. Un programme de dépistage néonatal existe en France depuis 1995, ciblé sur les populations à risque (essentiellement africaines, antillaises et maghrébines).² Chez le nouveau-né où l'HbF est largement majoritaire (environ 80 % de l'hémoglobine totale), le diagnostic ne peut être effectué que sur la faible fraction d'hémoglobine adulte présente à cet âge. Tant que l'HbF, qui s'oppose à la polymérisation de l'HbS, reste à un taux élevé, l'enfant est protégé des manifestations pathologiques liées à la drépa-

nocytose. C'est cependant dès ce stade que doit débiter la prise en charge d'un enfant atteint d'un syndrome drépanocytaire majeur pour prévenir tout facteur favorisant un accident infectieux ou vaso-occlusif.

CE QUI EST NOUVEAU

- La drépanocytose est aujourd'hui la plus fréquente des maladies génétiques en France et ne peut être ignorée du praticien.
- Un diagnostic effectué dès la naissance, ciblé sur les populations à risque, permet d'identifier les diverses formes génétiques de syndromes drépanocytaires majeurs et d'instaurer une prise en charge précoce évitant la survenue de complications graves.
- Le diagnostic nécessite un minimum de 2 tests, l'approche la plus judicieuse étant une focalisation isoélectrique suivie d'une électrophorèse sur gel d'agar. Tout résultat positif - ou douteux - demande confirmation du diagnostic par une étude des parents.
- Dans les populations à risque un conseil génétique doit être proposé.

* Service de biochimie, Inserm U468, hôpital Henri Mondor, 94010 Créteil Cedex. Courriel : henri.wajcman@im3.inserm.fr

Conseil génétique et diagnostic prénatal

Il est essentiel d'identifier les couples de porteurs d'anomalies de l'hémoglobine qui risquent d'avoir des enfants atteints d'un syndrome drépanocytaire majeur. Toute femme originaire d'une ethnie à risque, en âge de procréer, devrait donc bénéficier d'une recherche d'Hb anormale (essentiellement HbS) et d'un trait β -thalassémique. Un résultat positif implique alors impérativement l'étude du conjoint. Lorsque les deux partenaires sont porteurs d'HbS ou d'une association susceptible d'aboutir à un syndrome drépanocytaire majeur, le médecin praticien doit expliquer au couple le risque théorique de 25 % d'avoir un enfant atteint et de les orienter vers un généticien. Si les parents acceptent de prendre le risque d'une grossesse, ils doivent savoir qu'ils peuvent bénéficier d'un diagnostic prénatal à effectuer entre la 12^e et la 15^e semaines de gestation et d'une interruption thérapeutique de grossesse.

Ce diagnostic, qui s'effectue sur l'ADN du fœtus obtenu à partir d'une ponction amniotique ou d'une biopsie placentaire, ne peut évidemment être effectué que par un laboratoire de génétique agréé pour le diagnostic prénatal. Il n'est évidemment raisonnable de le pratiquer que si les parents acceptent sa sanction qui est l'interruption thérapeutique de grossesse. Il faut toutefois savoir qu'à la fois l'espérance et la qualité de vie des patients ont été considérablement améliorées au cours de ces dernières années. En fait, ce sont le plus souvent des familles qui ont déjà l'expérience d'un enfant gravement malade qui font appel à cette offre.

Il faut également rechercher l'HbS chez tout adulte jeune, originaire d'une ethnie à risque. Cette recherche dépiste exceptionnellement un cas homozygote, ou hétérozygote composite, encore silencieux. Elle a essentiellement pour objectif d'identifier les couples de porteurs d'anomalies de l'hémoglobine qui risquent d'avoir des enfants atteints d'un syndrome drépanocytaire majeur. Le conseil génétique (*v. encadré*), couplé à un diagnostic prénatal et à l'offre d'une interruption thérapeutique de grossesse, permet, si les parents le souhaitent, d'éviter la naissance d'un enfant porteur d'une maladie potentiellement grave. Il faut toutefois savoir qu'à la fois l'espérance et la qualité de vie des patients ont été considérablement améliorées au cours de ces dernières années.

Enfin, chez les malades, un bilan hémoglobinique complet permet de préciser la forme génétique en cause, et dans une certaine mesure d'en évaluer le pronostic.

DIAGNOSTIC D'UN SYNDROME DRÉPANOCYTAIRE MAJEUR

Le diagnostic de drépanocytose repose dans tous les cas sur l'identification formelle de l'HbS. La première étape du dépistage s'effectue généralement par focalisation isoélectrique (IEF) [fig. 1],³ ou encore par électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin bien que cette dernière technique soit moins précise et ne distingue pas l'HbS d'autres mutants comme l'HbD-Punjab parfois présente dans les mêmes populations. Dans l'HbS, le remplacement par une valine de l'acide glutamique en position 6 de la chaîne β de globine introduit dans le tétramère deux charges positives supplémentaires. Cette substitution élève le point isoélectrique de l'Hb de 6,95 à 7,25. Lors de l'électrophorèse à pH alcalin, l'HbS migre donc plus lentement que l'HbA vers l'anode.⁴

Certains laboratoires préfèrent utiliser en première intention une chromatographie liquide haute performance (CLHP) sur colonne échangeuse de cations. Des appareils automatisés permettent d'effectuer en quelques minutes l'analyse et le dosage des diverses hémoglobines (HbA₂, HbF, HbA, HbS, HbC...) identifiées par leur temps d'élution dans d'étroites fenêtres bien définies et parfaitement reproductibles. Les tableaux 1 et 2 donnent les valeurs obtenues respectivement chez l'adulte et le nouveau-né normal et drépanocytaire.

Dans tous les cas, le résultat d'un seul test est insuffisant pour affirmer le diagnostic d'HbS. Ce diagnostic doit être confirmé, que ce soit par chromatographie liquide haute performance,⁵ lorsqu'il est fait initialement par focalisation isoélectrique, ou par un test fonctionnel. Lors du dépistage néonatal, une suspicion de diagnostic positif implique toujours l'étude des parents.

Les tests fonctionnels sont destinés à mettre en évidence la solubilité diminuée de la désoxy-HbS ou sa migration caractéristique lors de l'électrophorèse sur gel

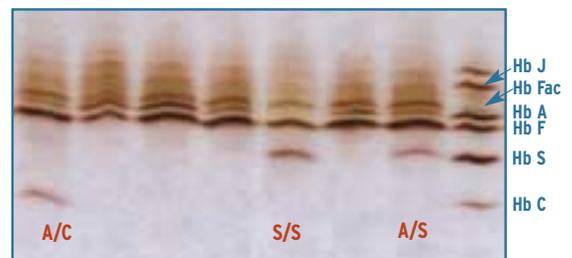


Figure 1 Détail d'une focalisation isoélectrique utilisée pour le diagnostic néonatal de la drépanocytose. Plus de 90 échantillons sont analysés sur une même plaque. Chez le sujet homozygote, la seule hémoglobine adulte visible est l'HbS, et chez les hétérozygotes on observe des hémoglobines A/S et A/C.

d'agar. La diminution de solubilité de l'HbS désoxygénée en milieu salin concentré est très spécifique de l'HbS ; elle est donc particulièrement utile pour son identification.^{6,7} Ce test n'est toutefois que semi-quantitatif et ne peut valablement faire la distinction entre les diverses formes génétiques de la maladie. De même il ne saurait être utilisé chez le nouveau-né ou chez un sujet porteur d'un taux faible d'HbS chez qui il peut être faussement négatif. L'électrophorèse sur gel d'agar est utilisable pour confirmation d'un diagnostic néonatal (fig. 2). Dans ce système, la mobilité de la molécule d'hémoglobine ne dépend pas de la charge du résidu muté, mais des modifications de structure induites par la mutation dans certaines régions positivement chargées de la protéine, dont en particulier celle impliquée dans l'HbS. Des tests de biologie moléculaire

sont parfois indiqués : faisant appel à des enzymes de restriction, comme Mst II, ils permettent de distinguer un codon 6 normal d'un codon 6 muté.⁸

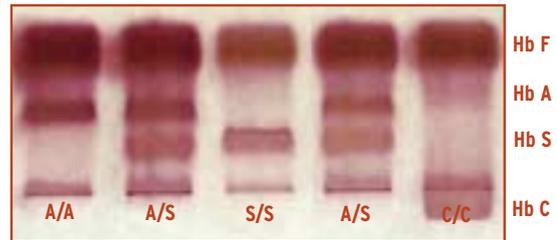


Figure 2 Détail d'une électrophorèse sur gel d'agar pour confirmation de diagnostic néonatal d'HbS.

Répartition schématique des diverses fractions de l'hémoglobine chez les adultes normaux et drépanocytaires.

	% HbA	% HbS	% HbF	% HbA ₂
■ Adulte normal	≈ 95	Absence totale	< 1	≈ 3
■ Drépanocytaire hétérozygote	60 à 75*	25 à 40*	< 1	≈ 3
■ Drépanocytaire homozygote	Absence totale	75 à 90	5 à 20 (variable avec âge, haplotype, traitement)	Normal (souvent artificiellement augmenté)
■ Hétérozygote composite avec une β ⁰ thalassémie	Absence totale	75 à 90	5 à 20 (variable avec âge, haplotype mutation et traitement)	Augmentée
■ Hétérozygote composite avec une β ⁺ thalassémie	25 à 30 (variable selon la mutation thalassémique)	> 50 (variable selon la mutation thalassémique)	(variable selon la mutation thalassémique)	(variable selon la mutation thalassémique)

Tableau 1 * Lors de l'association avec une α-thalassémie le taux d'HbS diminue proportionnellement au nombre de gènes α déléétés.

Répartition schématique des diverses fractions de l'hémoglobine chez les nouveau-nés normaux et drépanocytaires

	% HbA	% HbS	% HbF	% HbA ₂
■ Nouveau-né normal	10 à 20 *	Absence totale	80 à 90	< 0,5
■ Nouveau-né drépanocytaire hétérozygote	5 à 10	5 à 10	80 à 90	< 0,5
■ Nouveau-né drépanocytaire homozygote ou S/β ⁰ thalassémie	Absence totale	5 à 10	80 à 90	< 0,5

Tableau 2 * Selon le terme et le poids.

La figure 3 représente l'arbre de décision diagnostique et les différents examens à réaliser.

La forme homozygote (HbS/HbS) n'est pas la seule à être responsable d'un syndrome drépanocytaire majeur. Lors d'une hétérozygotie composite HbS/ β^0 thalassémie, l'HbS est le constituant hémoglobinique majeur de la cellule, ce qui conduit à un tableau drépanocytaire proche de celui observé chez l'homozygote. L'association d'une HbS à certaines hémoglobines anormales, comme l'HbD-Punjab ($\beta 121 \text{ Glu} \rightarrow \text{Gln}$) ou O-Arab ($\beta 121 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$), facilite la polymérisation de l'HbS et les hétérozygotes composites (HbS/HbD-Punjab) sont donc malades. Il en est de même pour les sujets associant HbS et HbC ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$) où les propriétés cellulaires de cette dernière provoquent une augmentation de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH). Ces hémoglobines doivent être identifiées, tant pour le diagnostic des malades que pour permettre un conseil génétique.

FACTEURS MODULATEURS D'UN SYNDROME DRÉPANOCYTAIRE MAJEUR

Le diagnostic biologique d'un syndrome drépanocytaire majeur ne saurait se limiter à la seule identification de l'HbS : il doit également faire le bilan des autres facteurs génétiques susceptibles d'en modifier l'expression clinique. C'est le cas du taux d'HbF, puisque des taux supérieurs à 10 % inhibent partiellement la falciformation, de l'association avec une α -thalassémie modulant en plus ou en moins certaines complications spécifiques, voire de la présence d'une autre anomalie érythrocytaire, tel un déficit en pyruvate-kinase favorisant la falciformation.

POUR LA PRATIQUE

- Comme le pronostic d'un syndrome drépanocytaire majeur est d'autant plus favorable que sa prise en charge est précoce, il est impératif d'en effectuer le diagnostic dès la naissance.
- Chez le nouveau-né, le taux d'HbF avoisine 80 % de l'hémoglobine totale et le diagnostic ne peut être effectué que sur la faible fraction d'Hb adulte présente à cet âge.
- Les tests que nous recommandons sont la focalisation isoélectrique en première intention et la chromatographie liquide haute performance pour confirmation.
- Tout résultat positif demande à être vérifié par l'étude des parents.
- Dans les populations originaires d'Afrique, des Antilles ou encore du Maghreb, il faut rechercher les couples à risques aussi bien de formes homozygotes que de celles causées par une hétérozygotie composite et leur proposer un conseil génétique.
- Enfin, chez le malade, un bilan hémoglobinique peut être un élément de pronostic, mais surtout il permet de suivre l'efficacité de certaines thérapeutiques.

La mutation drépanocytaire est apparue de façon indépendante dans au moins 5 populations africaines et de ce fait se trouve dans un environnement chromosomique spécifique à chacune d'elles. Ces environnements, appelés haplotypes, sont identifiés par des marqueurs fonctionnellement neutres correspondant à la présence ou à l'absence d'un certain nombre de sites permettant le clivage de l'ADN par des enzymes de restriction. Ces sites pourraient être eux-mêmes génétiquement liés à des régions impliquées dans l'expression ou le contrôle de l'une ou l'autre des fractions hémoglobiniques. On s'interroge régulièrement sur la valeur pronostique de ces haplotypes. Les haplotypes « Sénégal » et « arabo-indien » s'accompagnent souvent d'un taux plus élevé d'HbF et atténueraient la gravité du tableau. Cette augmentation est en rapport avec l'existence d'une séquence d'ADN, stimulant la synthèse de l'HbF, en déséquilibre de liaison avec l'un des sites polymorphes.

CONCLUSION

Le dépistage de la drépanocytose doit être organisé de façon à en faire le diagnostic le plus tôt possible dans la vie, afin de pouvoir prendre en charge l'enfant drépanocytaire avant même que se manifestent les premières complications de la maladie. Chez l'adulte jeune, son identification doit diriger un conseil génétique. Enfin, chez le malade, un bilan hémoglobinique peut être nécessaire pour évaluer un pronostic, mais surtout pour suivre l'efficacité de certaines thérapeutiques. ■

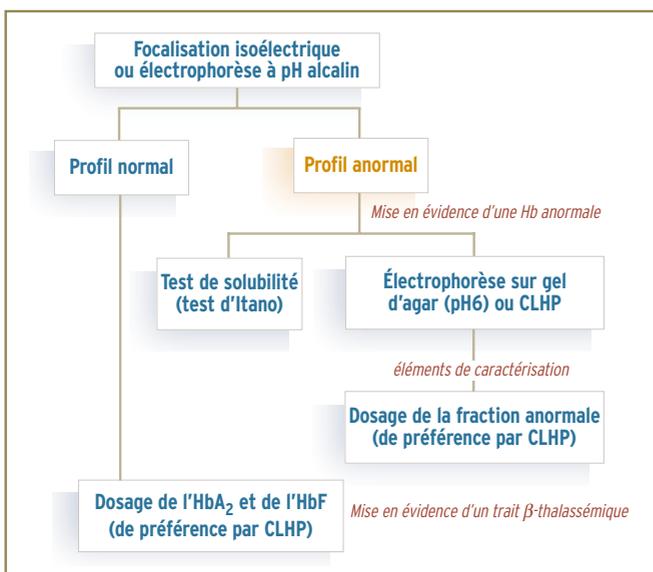


Figure 3 Arbre de décision diagnostique et examens à réaliser.
Hb : hémoglobine ; CLHP : chromatographie liquide haute performance.

SUMMARY Diagnosis and screening of sickle cell disease

Hemoglobin S (HbS), which causes sickle cell disease, is now the most common genetic abnormality observed in France. Sickle cell disease is a generic term covering all the syndromes in which HbS is present. The heterozygous situation, named sickle cell trait, is perfectly well tolerated in contrast to homozygous or compound heterozygous forms, which lead to sickle cell anemia. To prevent complications, diagnosis of HbS has to be done as early as possible in the first day of life. This diagnosis is usually done by isoelectric focusing, or cellulose acetate electrophoresis at alkaline pH, but more and more frequently by cation exchange HPLC. It should always be confirmed by a specific test for HbS, such as the solubility test or an electrophoresis on agar gel. In sickle cell anemia, it is important to evaluate the other factors that may modify the presentation (mostly HbF level and associated α -thalassaemia). In a heterozygous subject presenting with pathological manifestations, more sophisticated biochemical tests or molecular biology investigations may be necessary to determine the cause of the disease.

Rev Prat 2004 ; 54 : 1545-7

RESUMÉ Diagnostique et dépistage de la drépanocytose

L'hémoglobine S (HbS) est la plus fréquente des anomalies génétiques observées aujourd'hui en France. La forme hétérozygote est parfaitement bien tolérée, et seules les formes homozygotes ou hétérozygotes composites sont à l'origine de la maladie drépanocytaire. Comme les accidents liés à l'HbS se manifestent dès les premiers mois de la vie, à partir du moment où l'Hb adulte remplace l'HbF, il est important d'effectuer le diagnostic dans la période néonatale afin de pouvoir prévenir les complications. Le diagnostic d'HbS s'effectue généralement par focalisation isoélectrique ou par électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin, parfois remplacé par la chromatographie liquide haute performance sur colonne échangeuse de cations. Le diagnostic doit toujours être confirmé par un test reconnaissant spécifiquement l'HbS (test de solubilité, électrophorèse sur gel d'agar, voire test de biologie moléculaire). Lors des syndromes drépanocytaires majeurs, il est nécessaire de faire le bilan des principaux facteurs susceptibles de modifier l'expression clinique de la maladie (essentiellement taux d'HbF et présence d'une α -thalassémie associée). Enfin, chez un sujet hétérozygote symptomatique, des études biochimiques plus complexes au niveau de la protéine, ou de la biologie moléculaire, sont indispensables pour expliquer la cause des manifestations pathologiques.

RÉFÉRENCES

1. Nagel RL, Steinberg MH. Genetics of the β^s gene: origins, genetic epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In : Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL (eds). Disorders of hemoglobin. Cambridge : Cambridge University Press, 2001 : 711-55.
2. Benkerou M. (AFDPHE). Le dépistage néonatal ciblé de la drépanocytose en France métropolitaine: raisons et résultats. Mt Pédiatrie 2002 ; 3 : 159-63.
3. Basset P, Beuzard Y, Garel MC, Rosa J. Isoelectric focusing of human hemoglobin : its application to screening, to the characterization of 70 variants, and to the study of modified fractions of normal hemoglobin. Blood 1978 ; 51 : 971-82.
4. Bardakjian-Michau J, Dhont JL, Ducrocq R *et al.* Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. Ann Biol Clin 2003 ; 61 : 401-9.
5. Ducrocq R, Pascaud O, Bévier A *et al.* Strategy linking several analytical methods of neonatal screening for sickle cell disease. J Med Screen 2001 ; 8 : 8-14.
6. Greenberg MS, Harvey HA, Morgan C. A simple and inexpensive screening test for sickle hemoglobin. N Engl J Med 1972 ; 286 : 1143.
7. Schneider RG, Barwick RC. Hemoglobin mobility in citrate agar electrophoresis. Its relationship to anion binding. Hemoglobin 1982 ; 6 : 199-208.
8. Old JM. DNA-based diagnosis of the hemoglobin disorders. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL (eds). Disorders of hemoglobin. Cambridge : Cambridge University Press, 2001 : 941-57.
9. Wajcman H, Galactéros F. Drépanocytose : laboratoire et étude de l'hémoglobine. Bull Soc Pathol Exot 2001 ; 94 : 80-4.

Drépanocytose : le répertoire

ASSOCIATIONS, ORGANISMES, SITES...

www.drepanet.org

Ce site est tenu par le réseau francophone de lutte contre la drépanocytose. Différentes informations intéressantes s'y trouvent : un glossaire pour aider les patients à mieux comprendre le « jargon » médical ; un thème mensuel (priapisme ;

greffe de moelle ; crises douloureuses ; paludisme, etc.) ; les dates des congrès ; des appels à la solidarité, etc.

www.orpha.net

Choisir le menu maladie rare ; entrer drépanocytose puis cliquer sur « associations de patients ». Entrer France, cocher « pays » et cliquer sur « rechercher », 4 associations

présentes en France s'affichent : AFLT, APIPD, SOSglobo et AFDPHE (*v. infra*). En cliquant dessus vous accédez directement aux sites des associations.

APIPD

L'Association pour l'information et la prévention de la drépanocytose (7 ter, rue Édouard-Vaillant, 93400 Saint-Ouen ; tél. : 01 40 10 02 49) a un site très

simple, gai et didactique. Des informations très claires sont données aux patients. Plusieurs adresses permettent d'y accéder :
• www.orphanet.infobiogen.fr/associations/APIPD/APIPD.html
• <http://www.orpha.net/nestasso/APIPD/>
• http://orphanet.infobiogen.fr/associations/APIPD/_PP_4.html

(suite p. 1582)