

# Drépanocytose : laboratoire et étude de l'hémoglobine.

H. Wajcman & F. Galacteros

INSERM U468 et Biochimie, Hôpital Henri Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil Cedex, France.  
Tél : 01 49 81 35 78. Fax : 01 48 99 33 45. E-mail : henri.wajcman@im3.inserm.fr

Manuscrit n°2300/drépano 7. Journée "Drépanocytose et -thalassémie", Société de pathologie exotique, mercredi 13 décembre 2000, Paris, France.

## Summary: Sickle cell disease: laboratory investigations and hemoglobin study.

The diagnosis of any sickle cell disease syndrome is based on the unambiguous identification of HbS. Electrophoretic tests are usually the first to be performed. A much better resolution is obtained with isoelectric focusing than with the more conventional cellulose acetate electrophoresis at alkaline pH. In some laboratories the first test is cation exchange HPLC. The diagnosis of HbS should never be accepted if not confirmed by a second test, more specific of this Hb such as the solubility test or electrophoresis on agar in citrate buffer.

The laboratory should also evaluate other factors interacting with HbS, such as HbF level, sickle cell restriction haplotype, association with -thalassemias. It should also evaluate other cellular factors and, in case of symptomatic heterozygous patients, help to understand of the underlying mechanisms.

## Résumé :

Le diagnostic de drépanocytose repose dans tous les cas sur l'identification formelle de l'hémoglobine S (HbS). Le premier temps du diagnostic d'une HbS s'effectue généralement par focalisation isoelectrique ou encore, dans certains laboratoires, par électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin ou par CLHP sur colonne échangeuse de cations. Il doit toujours être confirmé par un test spécifique de l'HbS. Le laboratoire doit également faire le bilan des autres facteurs génétiques susceptibles de modifier l'expression clinique de la drépanocytose (HbF, haplotypes, -thalassémie) et apprécier les répercussions cellulaires. Enfin, chez un sujet hétérozygote symptomatique, il doit en expliquer la cause par des études biochimiques plus complexes au niveau de la protéine ou de la biologie moléculaire.

sickle cell disease  
HbS  
electrophoresis  
HPLC  
biological diagnosis

drépanocytose  
hémoglobine S  
électrophorèse  
CLHP  
diagnostic biologique

## Introduction

Quelle que soit la forme génétique de drépanocytose, son diagnostic repose toujours sur l'identification formelle de l'hémoglobine S (HbS). Les examens de laboratoire seront le plus souvent les seuls arguments d'une forme hétérozygote (HbA/HbS), habituellement cliniquement muette. Dans les syndromes drépanocytaires majeurs, ils permettront de préciser s'il s'agit d'une forme homozygote (HbS/HbS) ou d'une hétérozygotie composite associant l'HbS à une -thalassémie ou à une autre anomalie de l'hémoglobine (Hb D-Punjab, HbC ou HbO\_Arab, le plus souvent) et, dans une certaine mesure, de la ranger dans une catégorie pronostique. Chez les sujets hétérozygotes symptomatiques, le laboratoire s'appliquera à démontrer la coexistence d'une autre anomalie de l'environnement érythrocytaire, mutation additionnelle sur le gène de l'HbS (comme dans l'Hb S-Antilles) (11), déficit enzymatique (habituellement en pyruvate kinase) (3) facilitant la polymérisation de l'HbS ou maladie membranaire facilitant la déshydratation cellulaire.

Le premier temps du diagnostic d'une HbS s'effectue généralement par électrophorèse, ou mieux, par focalisation iso-

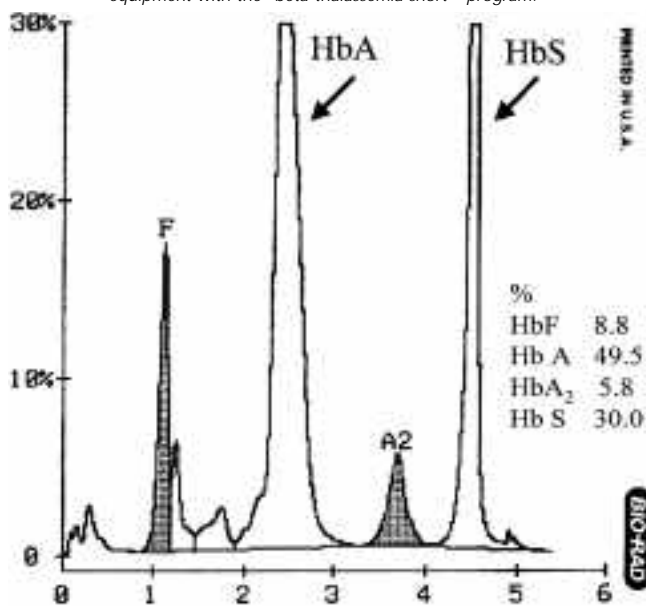
électrique. Dans certains laboratoires, la priorité est plutôt donnée à la CLHP sur échangeurs de cations, qui est une méthode plus facilement automatisable. Dans tous les cas, le résultat d'un seul test est insuffisant pour affirmer le diagnostic d'HbS. Il doit toujours être confirmé par un test fonctionnel mettant en évidence la solubilité diminuée de la désoxyHbS ou par une électrophorèse sur gel d'agar. Des tests de biologie moléculaire faisant appel à des enzymes de restriction sont parfois nécessaires.

Dans tout syndrome drépanocytaire majeur, le laboratoire ne se limite pas à l'identification de l'HbS : il doit également faire le bilan des autres facteurs génétiques susceptibles de modifier l'expression clinique de la drépanocytose. Parmi ces derniers, citons la détermination des haplotypes de restriction drépanocytaires, le niveau d'expression de l'HbF, l'existence d' -thalassémies associées, voire d'autres anomalies érythrocytaires. L'activité du laboratoire s'élargit, bien entendu, à l'étude des répercussions de la drépanocytose non seulement sur l'érythrocyte mais également sur d'autres organes, voire sur l'organisme entier. Ces derniers aspects dépassent largement le cadre étroit de cet article.

Figure 2.

Profil d'éluion en CLHP d'échange d'ions obtenu sur un appareil Variant (Bio-Rad) avec le programme " -thalassemia short".

Elution pattern obtained by ion-exchange HPLC using the Variant (Bio-Rad) equipment with the "beta-thalassemia short" program.



### Tests de solubilité

Lorsque l'HbS est désoxygénée par du dithionite (hydrosulfite de sodium), elle précipite en milieu salin concentré (tampon phosphate 2,8 M, pH 6,8) (6). Ce test est très spécifique de cette hémoglobine et est donc particulièrement utile pour son identification. Il n'est toutefois que semi-quantitatif et ne peut valablement faire la distinction entre les diverses formes génétiques de drépanocytose. De même, ce test ne saurait être utilisé chez le nouveau-né ou chez un sujet porteur d'un taux faible d'HbS où il peut être faussement négatif.

### Biologie moléculaire

Le diagnostic d'HbS peut également s'effectuer au niveau de l'ADN en utilisant des enzymes de restriction (13). La méthode la plus classique consiste à amplifier par PCR un fragment d'ADN contenant l'exon I de la chaîne  $\beta$  puis de soumettre ce replicon à l'action d'une enzyme de restriction et d'analyser les produits de digestion par électrophorèse. La mutation (A>T) détruit en effet un site reconnu par Dde I, Mnl I, Mst II ou l'un de leurs isoschyzomères. D'autres méthodes possibles sont l'utilisation d'une amorce modifiée pour la PCR (ARMS) ou l'hybridation par une sonde spécifique.

### Quelques pièges au diagnostic d'HbS

La possibilité de confondre un autre variant avec l'HbS diminue évidemment avec l'élargissement de la batterie de tests utilisés explorant des propriétés différentes de la molécule d'hémoglobine. Si on se limite à la focalisation isoélectrique ou à la CLHP, plusieurs variants peuvent, dans chacune de ces techniques, être pris pour de l'HbS. Dans la majorité des cas, l'utilisation combinée de ces deux abords permet de lever le doute et la quasi certitude du diagnostic est apportée par un test spécifique (solubilité ou électrophorèse sur gel d'agar). Il faut toutefois savoir que certains variants très rares peuvent simuler l'HbS à travers plusieurs de ces tests. L'exemple le plus frappant est celui de l'Hb G-Makassar où la substitution concerne le même résidu que l'HbS, transformé cette

fois en alanine: les tracés électrophorétiques (même sur gel d'agar) et chromatographiques de ces deux hémoglobines sont identiques, la solubilité de l'Hb G-Makassar est légèrement diminuée, les tests de biologie moléculaire sont douteux car le même nucléotide est affecté et ce n'est qu'au niveau de l'analyse structurale que se révèle la différence. L'Hb G-Makassar, le plus souvent rencontrée dans le Sud-est asiatique, est bien tolérée et ne donne pas de syndrome drépanocytaire.

## Facteurs modulant la drépanocytose

### Haplotypes drépanocytaires.

Le bilan biologique d'un patient drépanocytaire comporte l'identification de son haplotype (12). La mutation drépanocytaire est en effet apparue de façon indépendante dans plusieurs populations africaines et, de ce fait, se trouve dans un environnement chromosomique différent dans chacune de ces populations. Par l'utilisation de plusieurs marqueurs neutres, en déséquilibre de liaison avec la mutation drépanocytaire, cinq environnements géniques majeurs ont ainsi été définis. Il s'agit des haplotypes Bénin, Bantou, Sénégal, Cameroun et Arabo-indien. Les haplotypes Sénégal et Arabo-indien s'accompagnent souvent d'un taux plus élevé d'HbF avec surtout une plus forte expression de la chaîne  $\beta^G$ . L'haplotype Cameroun est en déséquilibre de liaison avec, d'une part, un polymorphisme de la chaîne  $\alpha^A$  caractérisé par la présence d'une thréonine au lieu d'une isoleucine en position 75 ( $\alpha^T$ ) et, d'autre part, d'une délétion de 4 nucléotides, responsable vraisemblablement d'une diminution d'expression des chaînes fœtales de globine codées par ce chromosome.

### HbF

L'HbF est un facteur pronostic important dans la drépanocytose puisque des taux élevés, supérieurs à 10 %, inhibent partiellement la falciformation. Le dosage d'HbF s'effectuait classiquement par résistance à la dénaturation alcaline (RDA). Lors d'un test cinétique qui met en contact un hémolysat avec une solution alcaline (NaOH 1,2N), l'HbA se dénature avant l'HbF et on peut considérer qu'après un temps de réaction de très exactement 2 minutes pratiquement, toute l'Hb A est dans le précipité et qu'environ 90 % de l'HbF se retrouvent dans le surnageant. Cette technique de dosage est utilisable pour des taux d'HbF compris entre 1 et 12 % (15, 16).

Aujourd'hui, la méthode de dosage la plus précise est certainement la CLHP en échange de cations telle qu'elle est pratiquée sur des appareils automatiques du type précédemment décrit.

L'expression des chaînes de globine fœtales s'étudie par CLHP en phase inverse (21). Chez les patients adultes porteurs d'HbF en quantité supérieure à la normale, les taux de  $\beta^G$  sont habituellement compris entre 40 et 60 %, quel que soit le niveau de stimulation de l'Hb F. Dans tous les cas où nous avons observé des taux plus élevés de chaînes  $\beta^G$ , le patient s'est avéré être homozygote pour l'haplotype Sénégal (22).

### Présence d' -thalassémies

L' -thalassémie due à la délétion de 3,7 kb est particulièrement fréquente dans les populations africaines où, dans certaines régions, plus de la moitié des individus en sont porteurs (12). Cette délétion, résultant d'un crossing-over entre les deux gènes  $\beta$ , est cause de la disparition d'un gène. Le gène restant est un gène recombinant qui est sous le contrôle du promoteur fort  $\beta^2$ .

8. KUTLAR A, KUTLAR F, WILSON JB, HEADLEE ME & HUISMAN THJ - Quantitation of hemoglobin components by high-performance cation-exchange liquid chromatography: its use in diagnosis and in the assessment of cellular distribution of hemoglobin variants. *Am J Hematol*, 1984, **17**, 39-53.
9. LEHMANN H & HUNTSMANN RG - *Man's haemoglobin*. - North Holland Publ. Co. édit. Oxford, Amsterdam, 1974.
10. LIN C, COTTON F, FONTAINE B, GULBIS B, JANSSENS J & VERTONGEN F - Capillary zone electrophoresis: an additional technique for the identification of hemoglobin variants. *Hemoglobin*, 1999, **23**, 97-109.
11. MONTPLAISIR N, MERAULT G, POYART C, RHODA MD, CRAESCU C *et al.* - HbS Antilles (  $\alpha_2\alpha_2\beta_6$  Glu -> Val,  $\beta_3\beta_3$  Val -> Ile): A new variant with lower solubility than Hb S and producing sickle cell disease in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1986, **83**, 9363-9367.
12. NAGEL RL & STEINBERG MH - Genetics of the  $\beta^s$  gene: origins, genetic epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. pp. 711-755. In : *Disorders of Hemoglobin*. - Eds MH STEINBERG, BG FORGET, DR HIGGS & RL NAGEL, Cambridge University Press, Cambridge, GB, 2001.
13. OLD JM - DNA-based diagnosis of the hemoglobin disorders. pp 941-957. In : *Disorders of Hemoglobin*. - Eds MH STEINBERG, BG FORGET, DR HIGGS & RL NAGEL, Cambridge University Press, Cambridge, GB, 2001.
14. PAULING L, ITANO HA, SINGER SJ & WELLS IC - Sickle cell anemia: a molecular disease. *Science*, 1949, **110**, 543-548.
15. PEMBREY ME, MC WADE P & WEATHERALL DJ - Reliable routine estimation of small amounts of foetal haemoglobin by alkali denaturation. *J Clin Pathol*, 1972, **25**, 738-740.
16. PREHU C, DUCROCQ R, GODART C, RIOU J & GALACTEROS F - Determination of HbF levels: The routine methods. *Hemoglobin*, 1998, **22**, 459-467.
17. RIGHETTI PG - *Isoelectric focusing: Theory, Methodology and Applications*. Elsevier, Amsterdam, 1983.
18. RIOU J, GODART C, HURTREL D, MATHIS M, BIMET C *et al.* - Evaluation of cation-exchange high-performance liquid-chromatography for presumptive identification of hemoglobin variants. *J Clin Chem*, 1997, **43**, 34-39.
19. SCHNEIDER RG & BARWICK RC - Hemoglobin mobility in citrate agar electrophoresis. Its relationship to anion binding. *Hemoglobin*, 1982, **6**, 199-208.
20. SCHNEIDER RG & BARWICK RC - Electrophoretic mobilities of mutant hemoglobins and mutant globin chains. In: SCHMIDT RM, FAIRBANKS VF, eds - *CRC Handbook Series in Clinical Laboratory Science*, Section I: Hematology Vol IV, Boca Raton, FL: CRC Press, 1986, 125-39.
21. WAJCMAN H, DUCROCQ R, RIOU J, MATHIS M, GODART C *et al.* - Perfusion chromatography on reversed-phase column allows fast analysis of human globin chains. *Anal Biochem*, 1996, **237**, 80-87.
22. WAJCMAN H, GALACTEROS F, HANICHIA, YAPOA & PREHUC - Hb F in the adult: could its composition discriminate normal from abnormal fetal globin gene expression? *C R Acad Sci Paris, Sciences de la vie/Life sciences*, 2000, **323**, 975-981.