

Diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux

Julie-Anne Rouvière

▶ **To cite this version:**

Julie-Anne Rouvière. Diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux. Sciences pharmaceutiques. 2008. hal-01738976

HAL Id: hal-01738976
https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01738976

Submitted on 20 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE Henry Poincaré – Nancy 1 **ANNEE 2008**

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE

en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES

DE BIOLOGIE MEDICALE

THESE

pour l'obtention du

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenus le 31 octobre 2008

par

Julie-Anne DO-ROUVIERE

DIAGNOSTIC DE LA SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE PAR CYTOMETRIE EN FLUX

JURY : **Président : Monsieur le Professeur Claude VIGNERON**

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Sylvain SALIGNAC

Assesseurs : Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE

Madame le Docteur Dominique STESCHENKO

UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN
Chantal FINANCE
Vice-Doyen
Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie
Pierre LABRUDE
Responsable de la Commission de la Recherche
Jean-Claude BLOCK
Directeur des Etudes
Gérald CATAU

Responsable de la Commission des Relations Internationales
Janine SCHWARTZBROD
Responsable de la Communication
Francine KEDZIEREWICZ
Responsable de la Commission Hygiène Sécurité
Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine : Gérald CATAU

Responsables de la filière Industrie : Isabelle LARTAUD
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du CEPH : Jean-Michel SIMON
(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Doyen Honoraire : Claude VIGNERON

Professeur Emérite : Gérard SIEST

Professeurs Honoraires

Roger BONALY
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMAN
Michel JACQUE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
François MORTIER
Maurice PIERFITTE
Louis SCHWARTZBROD

Maîtres de Conférences Honoraires

Marie-Claude FUZELLIER
Marie-Andrée IMBS
Marie-Hélène LIVERTOUX
Jean-Louis MONAL
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Assistante Honoraire
Madame BERTHE

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

Ð' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

Ð'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

Ðe ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Remerciements :

A Monsieur le Professeur Claude Vigneron

qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance pour l'intérêt que vous avez bien voulu témoigner pour ce travail, ainsi que de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Thomas Lecompte

qui me fait l'honneur de siéger à ce jury de thèse. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance pour votre enseignement qui m'a fait aimer l'hématologie lors de mon passage dans votre service, ainsi que de mon profond respect.

A Madame le Docteur Dominique Steschenko

qui me fait l'honneur de siéger à ce jury de thèse en sa qualité de clinicienne. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail en collaborant avec le service d'hématologie biologique.

A Monsieur le Docteur Sylvain Salignac

qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse. Merci de m'avoir confiée ce travail et de m'avoir permise de le mener à bien malgré la distance… Merci aussi pour ton précieux enseignement et ta disponibilité. J'espère ne pas t'avoir déçu et que nos routes professionnelles se recroiseront.

Aux techniciens du laboratoire d'exploration fonctionnelle cellulaire et de cytométrie en flux

pour leur accueil, leur gentillesse et leur disponibilité.

Je tiens à remercier tout particulièrement ***Viviane****, la reine des électrophorèses des membranes et des résistances globulaires. Merci pour ton professionnalisme, ta rigueur, ta gentillesse et ta disponibilité. Sans toi, ce travail n'aurait pas été possible.*

A Julien et Marie,

Merci pour les pauses café et les doo-waps…

A ma famille

A Frédéric

Sans qui je n'aurais pas passé l'internat et ne serais pas partie à l'autre bout de la France pendant quatre ans. Tu es mon moteur et mon énergie.

Je t'aime.

A XX ou XY

Nous attendons ta venue avec impatience…

A mes parents, bientôt grands-parents

Vous m'avez guidée étape par étape tout au long de ma vie afin que je fasse les meilleurs choix. Dans quelques mois, ce sera à notre tour de guider un petit être. J'espère être à votre hauteur.

A mon petit frère et sa fiancée

Merci d'être là depuis toujours et de m'avoir supportée comme « grande sœur »…

A ma belle-famille

Merci de m'avoir accueillie aussi chaleureusement dans votre famille il y a 8 ans. Nous avons partagé de grands moments de joie mais aussi de tristesse. J'espère que nous aurons encore beaucoup de bons moments à partager ensemble.

A ma famille lorraine

Grâce à l'internat, nous avons pu nous rapprocher et partager plein de moments forts. Vous nous avez tous accueilli très chaleureusement il y a quatre ans et c'est avec un pincement au cœur que nous quittons la Lorraine. Merci pour votre disponibilité et votre amour.

A Aline et Philou

Un grand merci pour votre présence et votre générosité.

A mes amis

A mes amis les plus proches : Agnès, Arnaud, Béa, Catherine, Jacques, Laurent, Matthieu, Marlène, Pauline, P-G, Stéphane

On s'était dit rendez-vous dans 10 ans…

Merci d'avoir toujours été à mes côtés dans les moments de joie comme dans les moments difficiles. Je suis heureuse d'avoir été le témoin des grandes étapes de vos vies et j'espère à dans 10 ans encore…

A mes Alsaciens préférés

***Mélanie**, merci pour ta gentillesse et ta présence. A nos soirées step du mardi soir et nos soirées ciné au Caméo qui vont me manquer…*

***Pierre**, merci pour ta gaieté et ta bonne humeur. A tous ces moments de rigolades passés à tes côtés qui vont me manquer…*

A tous mes autres amis montpelliérains et lorrains

A mes co -internes

A Alex

Tu as été mon co -interne pendant 2 ans et demi. Aujourd'hui nous finissons l'internat tous les 2 et j'espère que nos chemins professionnels se recroiseront.

A mes co -internes ntmois : Alix, Benja, J-B, Laurent, Natalie et Thomas

Merci pour votre bonne humeur et toutes ces parties de rigolades. Ce fut un plaisir de travailler avec vous.

LISTE DES ABREVIATIONS :

AE1 : protéine érythrocytaire échangeuse d'anions

AGLF : test de lyse au glycérol acidifié

AHAI : anémie hémolytique auto-immune

ASC : aire sous la courbe

BSA : albumine bovine fraction V

CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

CDA II : anémie dysérythropoïétique de type II

CMV : cytomégalovirus

DHPLC : denaturing high-performance liquid chromatography

EMA : éosine-5'-maleimide

GPA : glycophorine A

GPC : glycophorine C

Hb : hémoglobine

HE : elliptocytose héréditaire

HPP : pyropoïkylocytose héréditaire

Ig : immunoglobuline

IMF :intensité moyenne de fluorescence

LDH : lacticodeshydrogénases

MCF : mean channel fluorescence

RFLP : analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction

RG : résistance globulaire

RhAG : glycoprotéine associée au Rh

ROC : receiver operating characteristics

SAO : ovalocytose du sud-est asiatique

SDS-PAGE : électrophorèse des protéines de la membrane érythrocytaire sur gel de polyacrylamide SDS

SH : sphérocytose héréditaire

UGT1A1 : uridine diphosphate-glucuronyl transférase

VGM : volume globulaire moyen

VGMr : volume réticulocytaire

VPN : valeur prédictive négative

VPP : valeur prédictive positive

TABLE DES MATIERES :

INTRODUCTION **18**

PARTIE I : SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE : REVUE DE LA LITTERATURE **19**

1. LES BASES BIOCHIMIQUES DE LA SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE **20**

1.1. LA STRUCTURE SUPRAMOLECULAIRE DE LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE 20

1.1.1. La bicouche lipidique *21*

1.1.2. Les protéines transmembranaires ou protéines intégrales *22*

1.1.3. Le squelette membranaire *24*

1.1.4. Interactions entre les divers composants de la membrane érythrocytaire *31*

1.2. ANOMALIES BIOCHIMIQUES ASSOCIEES A LA SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE 33

2. LES BASES GENETIQUES DE LA SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE **34**

2.1. LES GENES IMPLIQUES DANS LA SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE 34

2.2. LES ALTERATIONS MOLECULAIRES DES PROTEINES DE LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE DANS LA SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE 35

2.2.1. Mutations du gène SPTA1 ..... *36*

2.2.2. Mutation du gène SPTB *37*

2.2.3. Mutation du gène ANK1 ..... *38*

2.2.4. Mutation du gène EPB3 ..... *41*

2.2.5. Mutations du gène ELB42 ..... *45*

3. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE **46**

3.1. PERTE DE SURFACE MEMBRANAIRE PAR MICROVESICULATION 47

3.2. INTERACTIONS ENTRE LA RATE ET LE SPHEROCYTE 49

3.3. ERYTHROSTASIS 49

3.4. DYNAMIQUE SPLENIQUE 50

3.5. MECANISME COMPENSATEUR DE L'HEMOLYSE 51

4. FORMES CLINIQUES, EVOLUTION ET COMPLICATIONS DE LA SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE **52**

4.1. CIRCONSTANCES DE DECOUVERTE 52

4.2. HISTOIRE NATURELLE DE LA MALADIE 52

4.2.1. Au cours de la première année de vie *53*

4.2.2. Les différentes formes cliniques chez l'enfant de plus de un an et l'adulte *54*

4.3. EVOLUTION ET COMPLICATIONS 57

4.3.1. Erythroblastopénie *58*

4.3.2. Lithiases biliaires *58*

4.3.3. Hémochromatose *59*
4.3.4. Hématopoïèse extra-médullaire *59*

5. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE 60

5.1. CRITERES DIAGNOSTIQUES SIMPLES PERMETTANT D'EVOQUER LE DIAGNOSTIC DE SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE 61
5.1.1. Hémogramme et indices érythrocytaires *61*
5.1.2. Morphologie des globules rouges *63*
5.1.3. Signes biologiques d'hémolyse *65*
5.2. EXAMENS SPECIFIQUES POUR LE DIAGNOSTIC DE SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE (TABLEAU 5) 65
5.2.1. Etude de la fragilité osmotique des hématies *66*
5.2.2. L'ektacytométrie en gradient osmolaire et l'élongation *69*
5.2.3. Méthode de cytométrie en flux après marquage des globules rouges avec l'éosine-5'-maleimide (EMA) *73*
5.2.4. L'électrophorèse des protéines de la membrane des globules rouges en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) *74*
5.2.5. Etude moléculaire *77*
5.3. RECOMMANDATIONS 2004 DU BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY POUR LE DIAGNOSTIC DE SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE 78

6. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL 79

6.1. L'ANEMIE HEMOLYTIQUE ACQUISE D'ORIGINE IMMUNE 79
6.2. LES ELLIPTOCYTOSES HEREDITAIRES (HE) SEVERES 80
6.3. LA STOMATOCYTOSE 82
6.4. L'OVALOCYTOSE DU SUD-EST ASIATIQUE (SAO) 83
6.5. LA DYSERYTHROPOÏESE CONGENITALE DE TYPE II (CDA II) 84

7. PRISE EN CHARGE 85

7.1. SUIVI MEDICAL ET BIOLOGIQUE 85
7.1.1. Durant la période néonatale *85*
7.1.2. Chez l'enfant en dehors de la période néonatale *85*
7.1.3. Chez l'adulte *86*
7.2. THERAPEUTIQUE 86
7.2.1. Supplémentation en folates *86*
7.2.2. L'érythropoïétine *86*
7.2.3. Splénectomie *87*
7.2.4. Cholécystectomie *88*
7.2.5. Transfusions *89*

PARTIE II : EVALUATION DU DIAGNOSTIC DE LA SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE PAR CYTOMETRIE EN FLUX 90

1. INTRODUCTION 91

2. MATERIELS ET METHODES 92

2.1. GROUPES DE PATIENTS 92
2.2. PARAMETRES DE L'HEMOGRAMME 93
2.3. RESISTANCE OSMOTIQUE GLOBULAIRE 93
2.2.1 Test avant incubation : 93
2.2.2. Test après incubation 24h à 37 °C : 94
2.2.3. Calcul des pourcentages d'hémolyse : 94
2.4. LIAISON DES GLOBULES ROUGES AVEC L'EMA ET ANALYSE EN CYTOMETRIE EN FLUX 95
2.5. SDS-PAGE 96
2.6. ANALYSE STATISTIQUE 99

3. RESULTATS 101

3.1. REPRODUCTIBILITE 101
3.1.1. Etude de la stabilité de l'EMA au cours du temps 101
3.1.2. Etude de la stabilité de l'EMA après marquage des globules rouges 102
3.1.3. Variation intra-individuelle 103
3.2. RESULTATS DES DIFFERENTS GROUPES DE PATIENTS 103
3.3. DETERMINATION DU SEUIL OPTIMAL ET CARACTERISTIQUES DU TEST 106
3.4. CORRELATION ENTRE LA CYTOMETRIE EN FLUX ET LA RESISTANCE GLOBULAIRE 108

4. DISCUSSION 109

TABLE DES ILLUSTRATIONS :

Figure 1. Schéma de la membrane érythrocytaire *20*
Figure 2. Représentation schématique de la protéine bande 3 ..... *22*
Figure 3. Représentation schématique de la structure des sous-unités α et β de la spectrine. *26*
Figure 4. Association des sous-unités α et β de la spectrine *26*
Figure 5. Examen au microscope électronique de préparations du squelette de la membrane érythrocytaire *28*
Figure 6. Représentation schématique des interactions verticales et horizontales de la membrane du globule rouge *32*
Figure 7. Schéma des interactions verticales attachant le cytosquelette à la double couche lipidique *33*
Figure 8. Schéma de transmission des deux mutations dans la famille étudiée *36*
Figure 9. Représentation schématique de la protéine bande 3 ..... *42*
Figure 10. Passage d'un globule rouge normal d'un cordon splénique vers un sinus veineux à travers un passage très étroit dans la rate *46*
Figure 11. Observation au microscope à balayage électronique des globules rouges d'un sujet sain (A) et d'un sujet atteint de sphérocytose héréditaire (B) *47*
Figure 12. Courbe de distribution des volumes érythrocytaires (automate Advia 2120 ; Siemens) *61*
Figure 13. Histogrammes des distributions des concentrations en hémoglobine (g/dL) (automate Advia 2120 ; Siemens) *62*
Figure 14. Sphérocytes sur frottis sanguin. MGG x 100 (photo de Sylvain SALIGNAC) *63*
Figure 15. Sphérocytes en "champignon" associés à un déficit en bande 3 sur frottis sanguin. MGG x 100 (photo d'après le CD « Collection Tutorial de Pathologie Editeur : TRIBVN © 2003 Anémies - Anomalies érythrocytaires ») *64*
Figure 16. Ektacytométrie en gradient osmolaire : courbe de déformabilité des globules rouges d'un patient normal. *70*
Figure 17. Ektacytométrie en gradient osmolaire : courbes de déformabilité des globules rouges de 4 patients atteints de sphérocytose héréditaire. *71*
Figure 18. Test d'élongation Lorca® *72*
Figure 19. Liaison de l'EMA avec la protéine bande 3 ..... *73*

Figure 20. Analyse des protéines de la membrane des globules rouges..... 75
Figure 21. Elliptocytes sur frottis sanguin. MGG x 100 (photo d'après le CD « Collection Tutorial de Pathologie Editeur : TRIBVN © 2003 Anémies - Anomalies érythrocytaires »).. 80
Figure 22. Overlay des histogrammes de fluorescence des globules rouges marqués à l'EMA d'un patient normal, d'un patient atteint de sphérocytose héréditaire (HS) et d'un patient atteint d'HPP..... 81
Figure 23. Stomatocytes sur frottis sanguin. MGG x 100 (photo d'après le CD « Collection Tutorial de Pathologie Editeur : TRIBVN © 2003 Anémies - Anomalies érythrocytaires »).. 82
Figure 24. Stomato-ovalocytes sur frottis sanguin. MGG x 100 (photo d'après le CD « Collection Tutorial de Pathologie Editeur : TRIBVN © 2003 Anémies - Anomalies érythrocytaires »)..... 83
Figure 25. Etude de la résistance globulaire osmotique d'un témoin et d'un patient atteint de SH..... 95
Figure 26. Overlay des histogrammes de fluorescence des globules rouges marqués par l'EMA d'un sujet témoin et d'un patient atteint d'une SH..... 96
Figure 27. Photographie du système de préparation des gels d'acrylamide au laboratoire d'exploration fonctionnelle cellulaire au CHU de Nancy 97
Figure 28. Photographie d'un gel d'acrylamide après migration et coloration par du bleu de Coomassie 98
Figure 29. Contrôle de la stabilité de la fluorescence de l'EMA (m : moyenne = 92,4 ; σ : écart-type = 13,6 ; m + 2 σ = 119,5 ; m – 2 σ = 65,1 ; points entourés en rouge = solution d'EMA fraîchement reconstituée) 102
Figure 30. Intervalles de confiance à 95 % des intensités moyennes de fluorescence des 8 groupes étudiés..... 104
Figure 31. Histogramme de fluorescence des globules rouges marqués à l'EMA d'un patient atteint de SH transfusé 1 mois avant l'analyse 105
Figure 32. Courbe ROC obtenue avec le logiciel SPSS 13.0..... 106
Figure 33. Corrélation entre la cytométrie de flux et la résistance globulaire 108
Figure 34. Stratégie diagnostique proposée 112

TABLE DES TABLEAUX :

Tableau 1. Principales caractéristiques des gènes et de leurs ARNm correspondant impliqués dans la sphérocytose héréditaire..... 34
Tableau 2. Fréquences des différentes mutations impliquées dans la sphérocytose héréditaire chez les populations nord-européennes 35
Tableau 3. Classification de la sphérocytose et indications pour la splénectomie d'après Eber et al..... 55
Tableau 4. Critères diagnostiques simples permettant d'évoquer le diagnostic de sphérocytose héréditaire. 61
Tableau 5. Examens biologiques spécifiques pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire 65
Tableau 6. Classification des patients de l'étude..... 92
Tableau 7. Stabilité de l'intensité de fluorescence de 6 témoins après marquage des globules rouges par l'EMA et conservation 48 heures à 4°C 102
Tableau 8. Etude de la variation intra-individuelle..... 103
Tableau 9. Sensibilité et spécificité de la cytométrie en flux 107

Introduction

Vanlair et Masius, en 1871, sont les premiers auteurs à décrire des « microcytes de forme parfaitement sphérique », baptisés plus tard sphérocytes par Naegli[1]. La présence de ces sphérocytes sur le frottis de sang est caractéristique de la sphérocytose héréditaire. La sphérocytose héréditaire est une anémie hémolytique héréditaire secondaire à des anomalies des protéines membranaires du globule rouge. Elle est très hétérogène en ce qui concerne l'expression clinique, le mode de transmission génétique et les étiologies moléculaires. La sphérocytose héréditaire a une prévalence de 1 pour 5000 dans les populations caucasiennes[2]. Le diagnostic de la sphérocytose héréditaire est difficile, il repose sur un faisceau d'arguments cliniques, familiaux et biologiques. Depuis sa découverte par Anatole Chauffard, au début du XX^{e} siècle, le test de fragilité osmotique est utilisé en routine pour le diagnostic de la sphérocytose héréditaire[1]. Ce test, ainsi que le test de l'auto-hémolyse et le test de lyse au glycérol acidifié (AGLF) manquent de sensibilité et de spécificité. Dans les formes légères ou atypiques de sphérocytose héréditaire, la fragilité osmotique peut être normale[3-4]. Cependant, une étude de la fragilité osmotique dans une population allemande de donneurs de sang suggère l'existence de formes extrêmement légères à modérées, élevant la prévalence à 1 pour 2000[5]. Actuellement, la technique la plus fiable pour le diagnostic de la sphérocytose héréditaire est l'étude par l'ektacytomètre de la déformabilité des globules rouges en fonction de l'osmolarité du milieu. Il s'agit d'une technique plus sophistiquée, très performante mais peu répandue[6]. L'étude de l'élongation est une variante de l'ektacytométrie. Le test de cryohémolyse identifie aussi les porteurs asymptomatiques de la maladie[7]. La confirmation du diagnostic de sphérocytose héréditaire par électrophorèse des protéines de la membrane érythrocytaire sur gel de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE) peut être nécessaire si les résultats des tests de dépistage sont équivoques[8]. Mais elle est réalisée seulement dans quelques laboratoires spécialisés et n'est donc pas appropriée en routine. Récemment, une technique de cytométrie en flux a été proposée comme un nouvel outil diagnostique pour la sphérocytose héréditaire[9]. Ce travail se propose d'évaluer cette nouvelle technique par rapport aux techniques actuellement utilisées au laboratoire d'hématologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Nancy (résistance globulaire, élongation et SDS-PAGE).

Partie I : Sphérocytose héréditaire : Revue de la littérature

1. Les bases biochimiques de la sphérocytose héréditaire

1.1. La structure supramoléculaire de la membrane érythrocytaire[10-11-12]

La membrane érythrocytaire désigne la bicouche phospholipidique, contenant les protéines transmembranaires, et le squelette érythrocytaire, assemblage de protéines entrelacées en mailles régulières et tapissant la face interne de la bicouche. Le squelette est en parti responsable de la forme et de la déformabilité du globule rouge. Il comprend plusieurs protéines dont la spectrine, l'ankyrine, l'actine et la protéine 4.1 (figure 1).

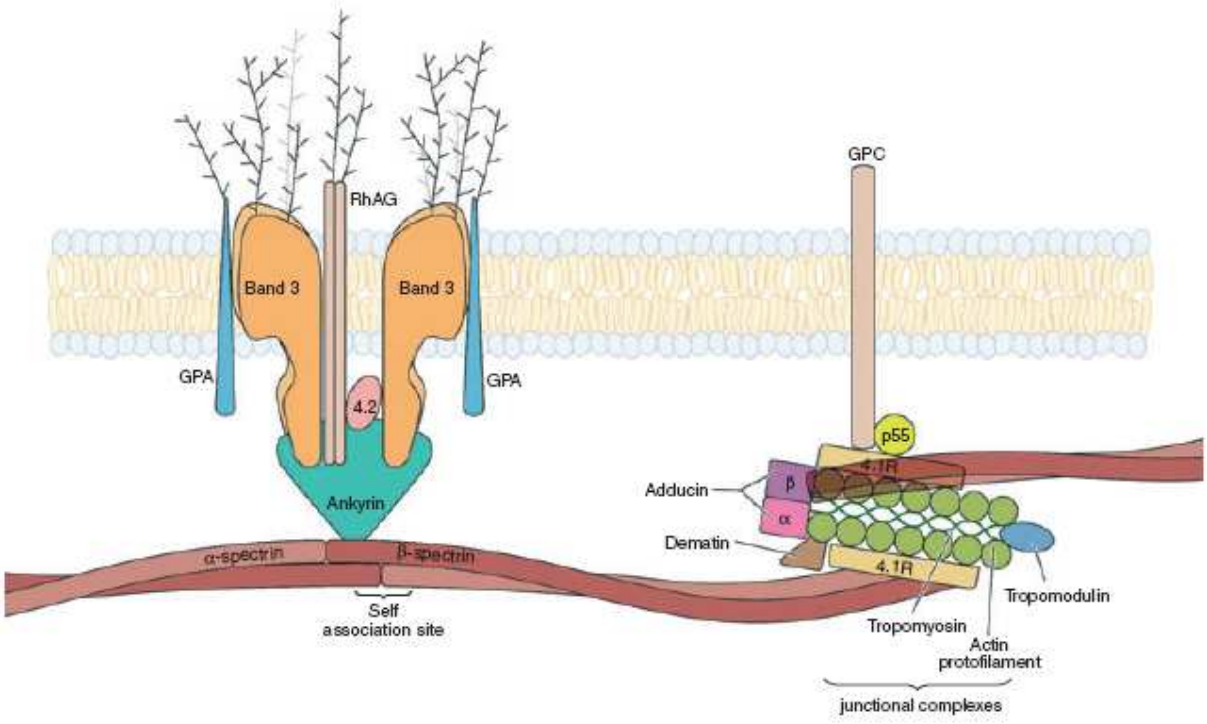


Figure 1. Schéma de la membrane érythrocytaire[13] (GPA : glycophorine A, GPC : glycophorine C, RhAG : glycoprotéine associée au Rh)

1.1.1. La bicouche lipidique[8]

Elle est constituée principalement de phospholipides. Les chaînes d'acides gras des phospholipides de chaque feuillet se font face à l'intérieur de la bicouche, constituant la partie hydrophobe. Les têtes polaires sont disposées vers le plasma (feuillet externe) ou le cytoplasme (feuillet interne). Ces phospholipides sont disposés de manière asymétrique dans la double couche : phosphatidylcholines et sphingomyélines prédominent dans le feuillet externe tandis que les aminophospholipides (phosphatidylsérines et phosphatidyléthanolamines) prédominent dans le feuillet interne. Les phospholipides ont tendance à changer d'emplacement malgré la difficulté pour les têtes polaires de franchir la barrière hydrophobe de la bicouche. Néanmoins, l'asymétrie demeure stable pendant toute la durée de vie des globules rouges grâce à des enzymes ATP-dépendantes, les translocases, qui assurent le phénomène de « flip-flop ». Ainsi les translocases des aminophospholipides, appelées les flippases, catalysent le retour des aminophospholipides du feuillet externe vers le feuillet interne. Les scramblases jouent un rôle opposé : la scramblase 1, activée par la phosphorylation d'une protéine kinase C, accélère la migration bidirectionnelle à travers la bicouche des phospholipides. Ceci peut jouer un rôle critique dans la formation du caillot de fibrine. C'est pourquoi plusieurs maladies génétiques de la membrane du globule rouge sont associées avec un état plus ou moins prononcé d'hypercoagulabilité.

Les autres composants lipidiques sont le cholestérol non estérifié (25%) et les sphingolipides (11%). Ces derniers, exclusivement localisés dans le feuillet externe, sont des récepteurs ou des antigènes.

Les flippases et les scramblases-1 sont également impliquées dans les mécanismes complexes d'apoptose des globules rouges. Le stress oxydatif induit *in vitro* par la t-butylhydroperoxyde active la caspase 3 ce qui entraîne la diminution des flippases. Les phosphatidylsérines sont alors externalisées, ce qui doit être propice *in vivo* à l'érythrophagocytose. La caspase 3 clive le domaine cytoplasmique de la protéine bande 3 en deux sites atypiques : Asp 45 et Asp 205. L'influx de calcium active la scramblase-1 et entraîne aussi l'externalisation de la phosphatidylsérine.

1.1.2. Les protéines transmembranaires ou protéines intégrales

Elles sont insérées dans la bicouche, qu'elles peuvent traverser. Beaucoup sont impliquées dans le transport d'ions et de petites molécules organiques. Le domaine extracellulaire est le plus souvent glycosylé et porte les antigènes de groupes sanguins. Le domaine intramembranaire est très hydrophobe et traverse la bicouche en une ou plusieurs hélices. Le domaine cytoplasmique est le domaine qui se lie avec les protéines périphériques.

a) La protéine bande 3

Elle est connue aussi sous le nom de protéine érythrocytaire échangeuse d'anions (AE1), elle est la plus abondante protéine intégrale de la membrane, représentant 25 à 30 % des protéines membranaires. Il existe environ 1 200 000 copies par cellule. Le gène EPB3 qui la code est situé sur le bras long du chromosome 17 dans la région 21 et est formé de 20 exons. La protéine, de 911 acides aminés, est clivée, par la trypsine ou la chymotrypsine, en deux domaines structuraux qui conservent leurs rôles fonctionnels spécifiques (figure 2).

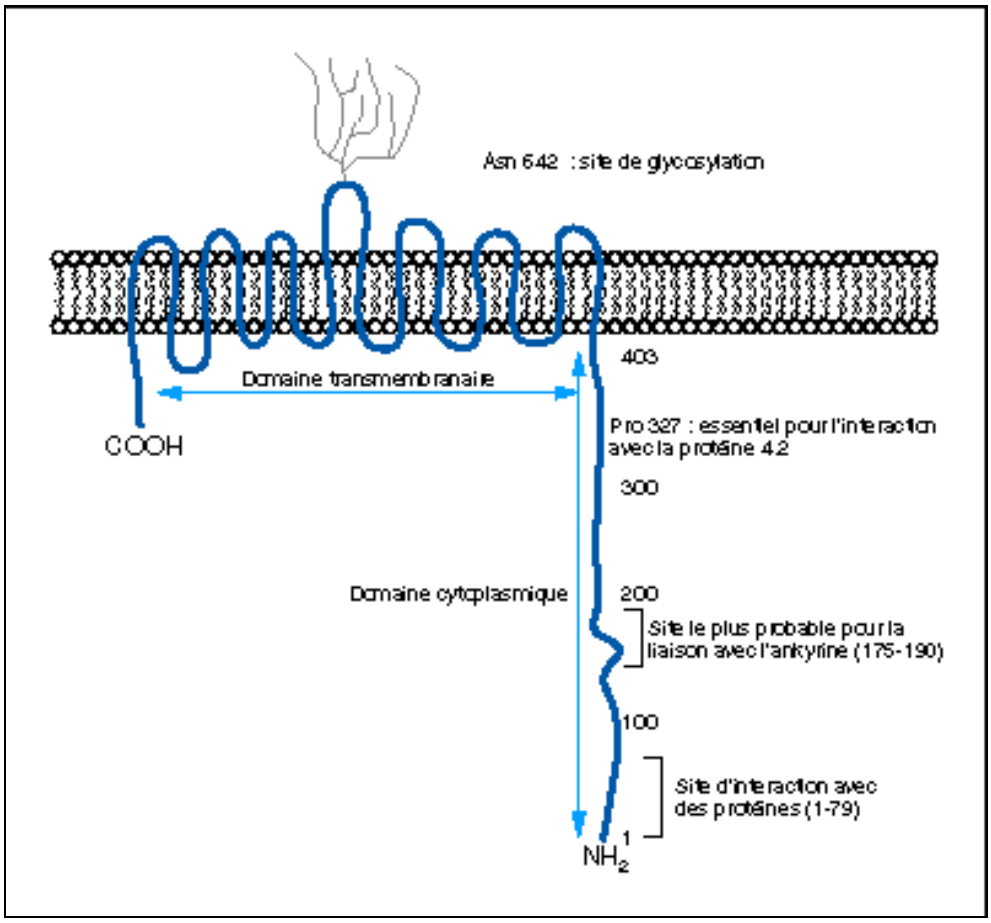


Figure 2. Représentation schématique de la protéine bande 3[11]

- Le domaine N-terminal, de 403 acides aminés et de poids moléculaire 43 kDa, est extramembranaire et placé sur la face cytoplasmique de la membrane érythrocytaire. Il possède les sites de liaison des différentes protéines cytoplasmiques et de squelette. L'association de cette région avec le domaine N-terminal de l'ankyrine a été largement étudiée, sans pouvoir pour autant définir exactement le site de liaison sur la protéine bande 3. L'étude des propriétés hydrodynamiques et de fluorescence du domaine cytoplasmique a indiqué qu'il s'agit de la région centrale, probablement formée par la région riche en résidus de proline, entre les positions 175 et 190. Cette région, tout comme les 79 premiers acides aminés, forment le site d'interaction avec la protéine bande 3, qui paraît assez complexe, impliquant plusieurs régions discontinues de la protéine bande 3. Les autres protéines du squelette qui se lient à ce niveau sont les protéines 4.1 et 4.2. On connaît mal leurs sites de liaison, le résidu de proline en position 327 est essentiel pour assurer une interaction correcte avec la protéine 4.2. Ce résidu est placé dans une région largement conservée chez le poulet, le rat, la souris et l'homme, ce qui peut suggérer un rôle physiologique important. La liaison de certaines protéines cytoplasmiques au domaine N-terminal de la protéine bande 3 assure une modulation de leur activité spécifique. Par exemple, l'ancrage des enzymes glycolytiques (glycéraldéhyde-3-phophate deshydrogénase, aldolase, phosphofructokinase) conduit à l'inhibition de leur activité enzymatique. Les hémochromes produits par l'oxydation et la dénaturation de l'hémoglobine se lient, eux aussi, à la région cytoplasmique de la protéine bande 3, et déclenchent un processus d'agglutination de ces protéines dans la membrane érythrocytaire. Celui-ci a été impliqué dans le mécanisme d'élimination des hématies âgées ou altérées, par l'action des anticorps autologues dirigés contre les épitopes de la protéine bande 3.

- Le domaine C-terminal (résidus 404-883), de 52 kDa, de cette protéine est incorporé dans la membrane plasmatique, formant plusieurs domaines transmembranaires qui traversent quatorze fois la membrane plasmatique, et sont interconnectés par des boucles intra- et extracellulaires. Sur une boucle extracellulaire se trouve le site de glycosylation (asparaginase 642). Ce domaine transmembranaire est responsable de l'activité de transporteur d'anions de la protéine bande 3, qui assure un efflux de HCO_3^- de la cellule, contre un influx de Cl^-. Cette fonction est remplie par des molécules isolées de la protéine ; cependant il y a de nombreuses preuves expérimentales qui montrent l'existence, dans les membranes, de dimères, tétramères et oligomères d'ordre supérieur. Les dimères ne sont pas liés au squelette membranaire et représentent la fraction mobile de la protéine bande 3, tandis que les tétramères sont fortement

attachés au squelette, par l'action de l'ankyrine à raison d'une molécule d'ankyrine pour chaque tétramère de protéine bande 3.

b) La glycophorine A[14]

Principale glycoprotéine membranaire, elle représente environ 1 à 2% de la totalité des protéines membranaires. De même que la protéine bande 3, la glycophorine A traverse la membrane de part en part. Elle est présente dans la membrane au nombre d'environ 370 000 molécules, la glycophorine a une masse moléculaire de 31 kDa. Le segment externe de la glycophorine A est formé des acides-aminés 1 à 72 à partir de l'extrémité N-terminale. Sur ce segment, sont fixés les radicaux oligosaccharidiques. Ce segment externe porte les antigènes de groupe sanguin MN sur les acides aminés 1 à 5 et les récepteurs pour les leptines et le virus de l'influenza. Le segment intramembranaire traverse la double couche lipidique sous forme d'une hélice α simple. Le segment interne de la glycophorine A (résidu 96 à 131) est en interaction avec le squelette membranaire et les constituants du cytosol. Les relations entre glycophorine A et protéine bande 3 ont été démontrées : en présence d'immun-sérums anti-glycophorine A spécifiques, la mobilité rotatoire de la protéine bande 3 est diminuée.

c) La glycophorine C

Le segment externe de la glycophorine C porte les antigènes de groupe sanguin Gerbich.
La liaison de cette glycophorine au squelette membranaire par l'intermédiaire de la protéine 4.1 est maintenant bien établie depuis deux décennies[15].

1.1.3. Le squelette membranaire

La stabilité et la déformabilité du squelette membranaire dépendent de l'intégrité des protéines qui le constituent et des interactions entre ces protéines et avec les autres composants membranaires protéiques et lipidiques.

a) La spectrine

C'est la protéine la plus abondante du squelette de la membrane érythrocytaire (environ 200 000 copies par cellule). Elle est constituée de deux chaînes α (280 kDa et 2429 acides aminés) et de deux chaînes β (246 kDa et 2137 acides aminés), qui sont codées respectivement par deux gènes SPTA1 et SPTB, situés sur les chromosomes 1q22-q23 et 14q23-q24.2. Par une digestion partielle à la trypsine, la chaîne α de la spectrine est clivée en cinq régions (nommées αI à αV), tandis que la chaîne β est clivée en quatre régions (nommées

βI à βIV). Cette dénomination est largement utilisée pour identifier le domaine de la molécule qui est affecté par une mutation génétique.

Les deux sous-unités présentent une organisation structurale assez similaire, représentée par des répétitions d'environ 106 acides aminés, chaque répétition étant formée de trois segments hélicoïdaux, arbitrairement nommés 3, 1 et 2 (allant de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale de la séquence répétitive), qui sont interconnectés par des segments non hélicoïdaux. Les hélices 1 et 2 d'une répétition se combinent avec l'hélice 3 de la répétition suivante, pour former une structure en triple hélice, dont l'axe est tourné de 60° par rapport à la structure suivante (figure 3). Dans la structure de base, les deux sous-unités sont associées d'une manière anti-parallèle, pour former un hétérodimère. L'association des deux sous-unités commence à des sites spécifiques des deux protéines, nommés sites de nucléation, et se propage le long des molécules, comme une fermeture éclair. Les sites de nucléation ont été identifiés entre les répétitions 19 à 22 de la sous-unité α, et les répétitions 1 à 4 de la sous-unité β. A leur tour, les dimères s'associent par leurs segments initiaux (têtes), pour former des tétramères et des oligomères d'ordre supérieur (figure 4). Cette association implique la région N-terminale de la sous-unité α d'un hétérodimère (qui contient seulement une hélice 3) et la répétition 17 de la sous-unité β (contenant uniquement les hélices 1 et 2) de l'autre hétérodimère, qui est placée vers l'extrémité C-terminale de la molécule. L'association de ces deux régions donne une très grande stabilité au tétramère de la spectrine.

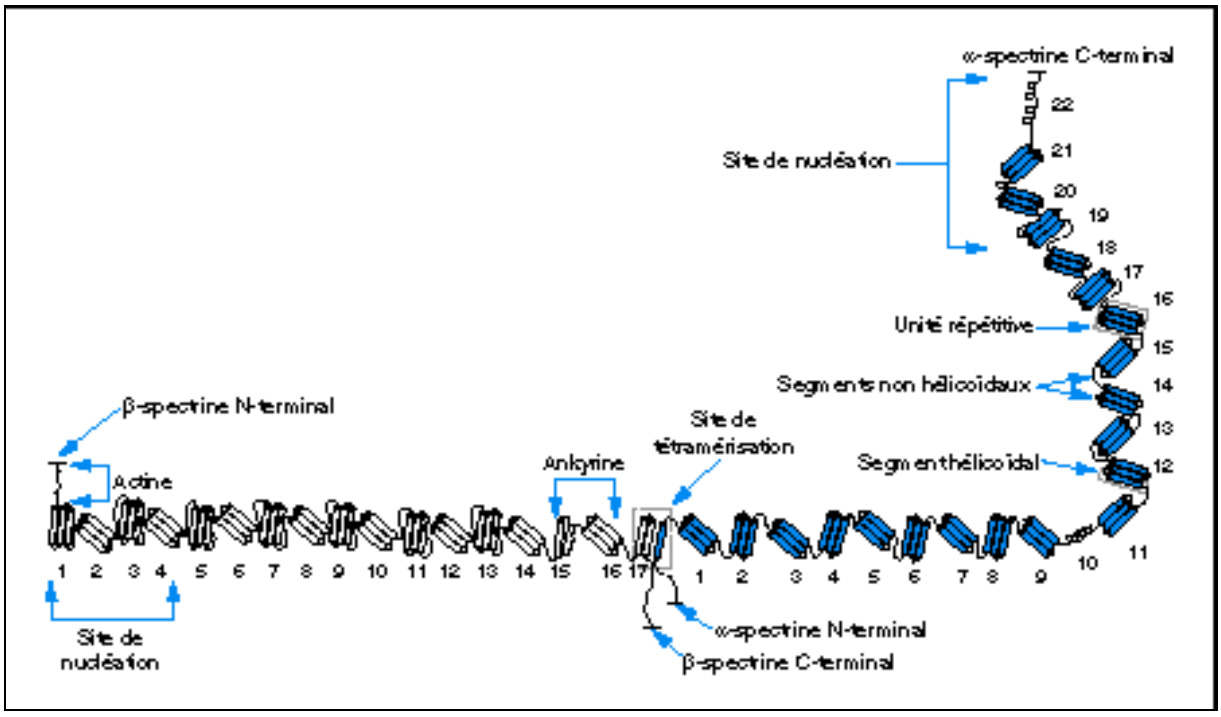


Figure 3. Représentation schématique de la structure des sous-unités α et β de la spectrine[11]

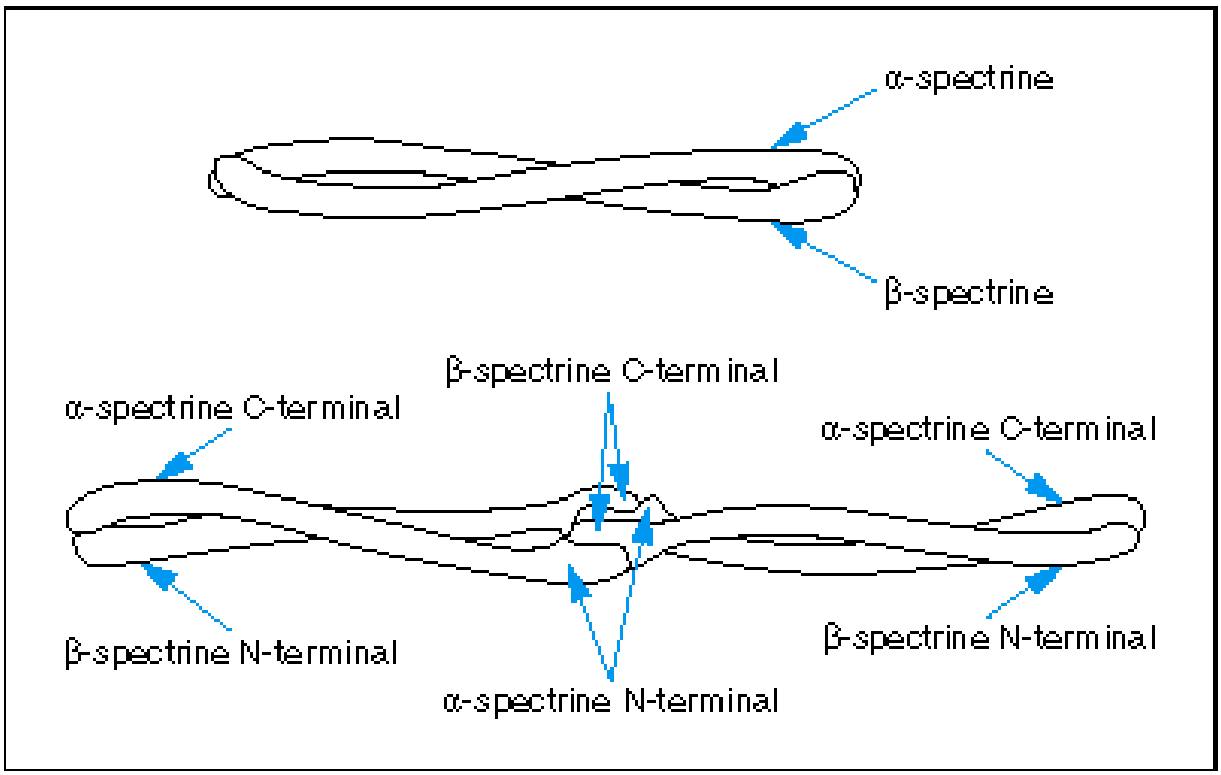


Figure 4. Association des sous-unités α et β de la spectrine pour former un hétérodimère (en haut) et un tétramère (en bas) [11]

L’examen en microscopie électronique (figure 5), de préparations du squelette de la membrane érythrocytaire, met en évidence la présence d’un réseau régulier hexagonal, ou plus rarement pentagonal ou heptagonal, dont les chaînes sont formées par des tétramères de spectrine, longues de 200 nm, qui font la liaison entre des filaments courts (40 nm) d’actine, placés aux nœuds du réseau (appelés encore complexes jonctionnels). L’interaction, entre les filaments de spectrine et ceux d’actine est assurée par la région N-terminale des sous-unités β, dont la composition en acides aminés est différente de celle des régions répétitives de la spectrine, mais qui est similaire à celle d’autres molécules qui se lient à l’actine. Cette interaction semble être stabilisée par l’action de la protéine 4.1, qui, elle aussi, se lie à la sous-unité β de la spectrine, dans une région assez mal définie, placée tout près de l’extrémité N-terminale de la molécule. Ce réseau de spectrine, qui forme la base du squelette membranaire, est ancré à la membrane par des molécules d’ankyrine, qui forment des ponts de liaison vers la protéine bande 3, qui est intégrée dans la membrane (figure 1). Le site de la liaison de l’ankyrine a été localisé sur les répétitions 15 et 16 de la sous-unité β de la spectrine (figure 3).

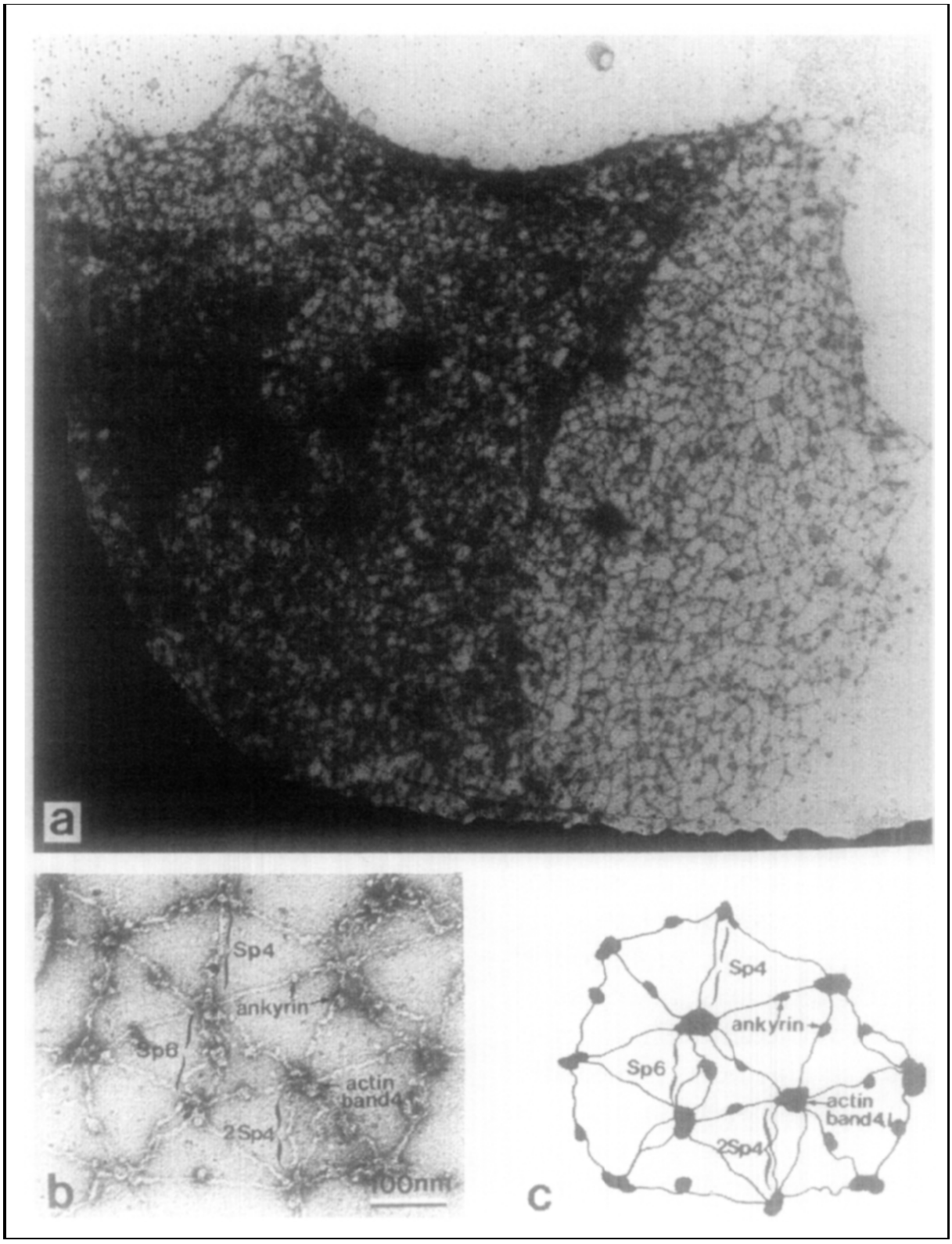


Figure 5. Examen au microscope électronique de préparations du squelette de la membrane érythrocytaire[12]

b) L’ankyrine

L’ankyrine érythroïde est la principale protéine d’ancrage du squelette membranaire. Elle a un poids moléculaire de 210 kDa et contient 1880 acides aminés. Elle est codée par le gène ANK1 situé sur le bras court du chromosome 8 dans la région 11.2 et contenant 42 exons. Trois régions structurales de la protéine ont été identifiées, correspondant à trois domaines fonctionnels différents :

- La région N-terminale de 89 kDa, allant du résidu 2 au résidu 827 d’acides aminés, est formée de 24 motifs de séquence répétitive. Ces répétitions, pour la plupart de 33 acides aminés, sont codées presque toutes par le même exon, ce qui suggère qu’il est possible qu’elles aient été produites par la duplication d’un seul mini-gène ancestral. Quinze des 33 résidus sont fortement conservés parmi les répétitions. Deux sites de liaison pour la protéine bande 3, placés sur les répétitions 7 à 12 et 13 à 24, ont été identifiés. D’autres protéines, comme la tubuline et la Na^+K^+-ATPase se lient aussi à ce domaine.
- Le domaine suivant, de 62 kDa, allant du résidu 828 au résidu 1382, a une séquence d’acides aminés qui a été fortement conservée entre la souris et l’homme et contient le site de liaison à la spectrine, probablement formé par les régions initiales et médianes du domaine.
- La portion C-terminale de l’ankyrine, de 55 kDa, est considérée comme étant le domaine régulateur, car les troncations et les coupures alternatives des introns qui peuvent arriver naturellement dans cette région modifient l’attachement de l’ankyrine à la spectrine et à la protéine bande 3.

c) La protéine 4.1 ou 4.1R

La protéine 4.1 est un composant clé du squelette. Elle est présente à environ 200 000 copies par cellule et a un poids moléculaire apparent de 78 kDa. Le gène codant pour cette protéine est localisé au niveau du chromosome 1p33-p34.2. Par digestion partielle à la trypsine, quatre domaines structuraux majeurs ont pu être identifiés, ayant des poids moléculaires de 30, 16, 10 et 22-24 kDa. Le domaine de 10 kDa contient le site de liaison (d’une grande affinité) avec la sous-unité β de la spectrine et forme ainsi un site de liaison à l’actine de moindre affinité et dépendant de la calmoduline. Le domaine de 30 kDa assure la liaison aux protéines intégrales de membrane : protéine bande 3, glycophorine C. Le calcium Ca^{2+}, en association avec la calmoduline, joue un rôle critique dans la régulation de l’interaction du domaine de 30 kDa avec la protéine bande 3 et la glycophorine C[16].

Il serait donc possible que cette protéine joue un rôle d'ancrage du réseau spectrine-actine du squelette à la membrane cellulaire similaire à celui de l'ankyrine. L'affinité de la liaison avec la protéine bande 3 est 30 fois moins élevée que celle avec la glycophorine C, mais il y a à peu près deux fois plus de sites de liaison disponibles. Cette liaison se produit au même site que celui utilisé par l'ankyrine, situé sur le domaine cytoplasmique de la protéine bande 3 et est soumise à régulation par une kinase. A partir de cette compétition entre protéine 4.1 et ankyrine pour le site de liaison à la protéine bande 3, An Xiu-Li et coll.[17] proposent un mécanisme de régulation de la stabilité membranaire et de la déformabilité cellulaire de l'érythrocyte. Ils considèrent que la dissociation de la protéine 4.1 de protéine bande 3 permet la liaison, avec une grande affinité, de l'ankyrine au même site, ce qui conduit à une association accrue de la protéine bande 3 au squelette membranaire. Cette association réduit la possibilité des tétramères de spectrine de se déplier et de s'allonger, en réduisant ainsi la déformabilité de l'hématie et en augmentant, en même temps, la stabilité de sa membrane plasmatique. L'affinité de la protéine 4.1 pour la glycophorine C est très grande et beaucoup de données expérimentales suggèrent la possibilité d'un ancrage du squelette membranaire à la membrane cellulaire par un pont formé par la protéine 4.1. Cette protéine joue le rôle d'un double régulateur de la stabilité de la membrane cellulaire : d'une part, la stabilisation de son complexe avec la glycophorine C forme des ponts supplémentaires entre le squelette et la membrane et permet la formation des ponts ankyrine-bande 3 ; d'autre part la déstabilisation de ce complexe met la protéine 4.1 en compétition directe avec l'ankyrine pour le site de liaison de la bande 3, en déstabilisant ainsi l'autre catégorie de ponts. Cela peut expliquer la coopérativité négative démontrée par l'ankyrine dans son interaction avec les membranes érythrocytaires. Les observations *in vivo* mettent en évidence que l'absence totale de la protéine 4.1 ne conduit pas seulement à une désorganisation du squelette membranaire, mais aussi à une altération profonde de la distribution et de l'agrégation des protéines membranaires. Cela démontre le rôle crucial joué par la protéine 4.1 dans la régulation des propriétés mécaniques et la stabilité de la membrane plasmatique des hématies.

d) La protéine 4.2

C'est une protéine périphérique, de 72 kDa, qui est présente à environ 200 000 copies par cellule. Elle représente environ 5 % du contenu protéique des membranes cellulaires. Son gène ELB 42 est situé sur le chromosome 15 (q15 à q21) et est formé de 13 exons et 12 introns. La fonction directe de cette protéine n'est pas claire, à part son interaction avec la

protéine bande 3, *in vivo* et *in vitro*, qui pourrait stabiliser celle avec l'ankyrine[18]. Les acides aminés 61 à 75 sont essentiels pour cette interaction. D'autres interactions possibles seraient celles avec les protéines 4.1 et l'ankyrine, qui pourraient expliquer l'effet physiopathologique des mutations de cette protéine du squelette.

e) L'adducine

C'est une protéine qui se lie à l'actine et qui est considérée comme étant le facteur régulateur de la formation des réseaux spectrine-actine. Elle est localisée à la jonction des tétramères de spectrine avec les filaments d'actine et a été purifiée, initialement, à cause de sa capacité à se lier à la calmoduline. Il y a trois gènes apparentés qui codent l'adducine, α, β et γ qui sont exprimés dans de nombreux tissus. Dans l'érythrocyte, l'adducine est présente sous la forme d'hétéromères formés par l'association de sous-unités α et β. Toutes ces formes ont la même structure moléculaire : un domaine globulaire N-terminal de 39 kDa (résidus 1-354), résistant aux protéases nommés tête, qui est connecté par un domaine de 9 kDa (résidus 355-435) nommé cou à une queue sensible aux protéases, formant la région C-terminale de 33 kDa (résidus 436-726). La portion C-terminale de chaque molécule contient une série de 22 acides aminés fortement basiques, dont la séquence est similaire au domaine de la protéine MARKS. Cette région est nécessaire pour les interactions de l'adducine avec l'actine et la spectrine. Au même niveau, on trouve le site de liaison de la calmoduline et le site de phosphorylation (sérine-RTPS) par la protéine kinase C et la protéine kinase A (AMPc dépendante). La phosphorylation de ce site a pour effet l'inhibition de la liaison à la calmoduline de l'adducine. Une fois formé, le complexe adducine-calmoduline permet une régulation par l'ion calcium de l'activité de stoppage (capping) des filaments d'actine et de recrutement de la spectrine pour l'association avec l'actine.

1.1.4. Interactions entre les divers composants de la membrane érythrocytaire

Schématiquement, il y a deux types d'interactions : les interactions verticales entre le squelette membranaire et la bicouche lipidique et les interactions horizontales entre les protéines constituant la trame du cytosquelette (figure 6). Les principales protéines impliquées dans les interactions verticales sont la protéine bande 3, l'ankyrine, la spectrine et la protéine 4.2. Les interactions horizontales ont lieu entre les chaînes α et β de la spectrine, la chaîne β de la spectrine et la protéine 4.1 et entre la protéine 4.1 et l'actine[19].

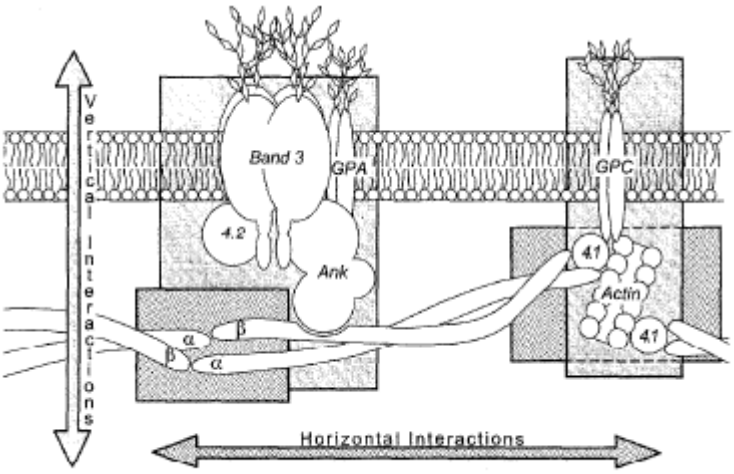


Figure 6. Représentation schématique des interactions verticales et horizontales de la membrane du globule rouge[12]

Nouvelles données sur les interactions entre les protéines de la membrane érythrocytaire et le squelette membranaire[15]:

Associé au « complexe bande 3 » (constitué de la protéine bande 3, l'ankyrine, la protéine 4.2 et la glycophorine A), des études récentes ont aussi découvert un complexe macromoléculaire appelé « complexe Rh » incluant cinq protéines : la glycophorine B, le polypeptide Rh, la glycoprotéine associée au Rh (RhAG), la glycoprotéine Landsteiner-Wiener et le CD47.

Nombre de protéines de groupes sanguins interagissent avec le réseau spectrine-actine et constituent des points d'ancrages pour le squelette membranaire érythrocytaire. En particulier, le domaine cytoplasmique de RhAG avec l'ankyrine et le domaine cytoplasmique de Lu et de XK avec des domaines différents de l'α-spectrine. Ces interactions jouent un rôle important dans le maintien des propriétés mécaniques des érythrocytes.

1.2. Anomalies biochimiques associées à la sphérocytose héréditaire

La morphologie anormale du globule rouge dans la sphérocytose héréditaire est due à des dysfonctionnements dans les interactions verticales entre la protéine bande 3, la spectrine, l'ankyrine et la protéine 4.2 (figure 7)[19].

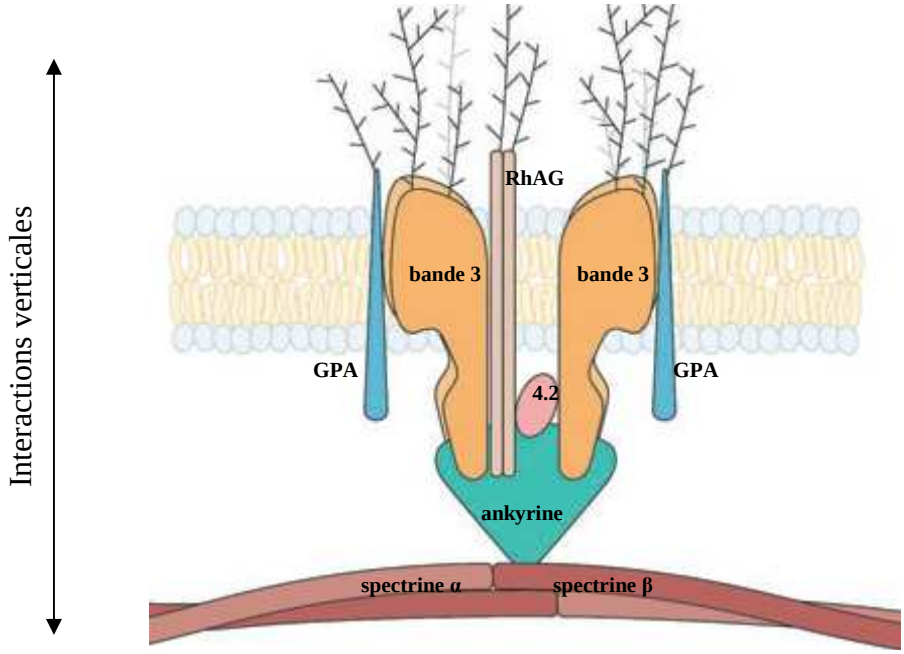


Figure 7. Schéma des interactions verticales attachant le cytosquelette à la double couche lipidique[13]

Bien que les anomalies de la protéine 4.1 soient habituellement associées à l'elliptocytose héréditaire, quelques cas de sphérocytose héréditaire dues à un défaut de la liaison de la protéine 4.1 à la spectrine ont été décrits[20].

2. Les bases génétiques de la sphérocytose héréditaire

2.1. Les gènes impliqués dans la sphérocytose héréditaire[21]

Les gènes codant les protéines de la membrane de l'érythrocyte et leurs emplacements chromosomiques respectifs sont connus (tableau 1).

	GeneBank accession	*Gene symbol*	*Chromosome location*	*Gene size (kb)*	*Exon number*	*mRNA size (kb)*	*Coding sequences (amino acid number)*
Spectrin α-chain	M61887	SPTA1	1q22-q23	80	52	8.0	2429
Spectrin β-chain	J05500	SPTB	14q23-q24.2	>100	32*	7.5	2137
Ankyrin 1	X16609	ANK1	8p11.2	~160	42	9.0-7.2	1880
Protein AE1	M27819	EPB3	17q12-q21	17	20	4.7	911
Protein 4.2	M30646	ELB42	15q15-q21	20	13	2.4	691

**additional exons are spliced in within skeletal muscle (in the 3'-side of the coding sequence).*

Tableau 1. Principales caractéristiques des gènes et de leurs ARNm correspondant impliqués dans la sphérocytose héréditaire[22]

Dans l'état actuel des connaissances, tous les gènes, sauf ELB42, appartiennent à des familles de gènes. Dans un type cellulaire et à des étapes données de sa différenciation, les gènes d'une famille s'expriment selon un éventail spécifique, l'expression de l'un d'entre eux étant souvent dominante. Un gène particulier, de plus, s'exprime selon des isoformes variables d'un type cellulaire à un autre, ainsi qu'aux différents stades de différenciation traversés. La diversification des produits d'un gène s'appuie, pour ce faire, sur les ressources de la transcription, de l'épissage, de la traduction et/ou des remaniements post-traductionnels alternatifs. Ainsi, en accord avec les exigences fonctionnelles de la cellule, à tel ou tel moment de son existence, un gène peut donner naissance à une variété inouïe d'isoformes polypeptidiques[10].

2.2. Les altérations moléculaires des protéines de la membrane érythrocytaire dans la sphérocytose héréditaire

Par ordre décroissant de fréquence, les gènes mutés sont ANK1, EPB3, SPTB, ELB42 et SPTA1 (tableau 2).

ankyrine	50 – 60 %
spectrine	20 %
protéine bande 3	15 – 20 %
protéine 4.2	< 5 %
complexe Rh	< 1 %
Non identifié	10 %

Tableau 2. Fréquences des différentes mutations impliquées dans la sphérocytose héréditaire chez les populations nord-européennes[13]

Différents mécanismes moléculaires peuvent générer le même déficit protéique dans la sphérocytose héréditaire. La plupart des mutations rapportées dans la sphérocytose héréditaire sont « privées » ou sporadiques c'est-à-dire qu'elles sont uniques pour une famille donnée. La connaissance du gène muté n'influe en rien la prise en charge clinique des patients.

Les mutations responsables de la sphérocytose héréditaire sont :

- soit des mutations du cadre de lecture correspondant à des délétions ou des insertions d'un nombre variable de nucléotides aboutissant à une altération de l'extrémité C-terminale de la protéine,
- soit des mutations non sens provoquant un arrêt prématuré de la traduction et la formation d'une protéine tronquée,
- soit des mutations faux sens correspondant à la substitution d'une paire de base,
- soit des mutations du site d'épissage provoquant un épissage anormal lors de la transcription,
- soit des délétions importantes du génome.

Un catalogue régulièrement mis à jour de toutes les mutations responsables d'anomalies de la membrane érythrocytaire est disponible sur le site web de the Human Gene Mutation Database[23].

2.2.1. Mutations du gène SPTA1

Les cas de sphérocytose héréditaire due à des mutations du gène SPTA1, codant la chaîne α de la spectrine, sont absolument exceptionnels et sont associés aux formes récessives de sphérocytose héréditaire. La raison en est aisément compréhensible si l'on sait que les chaînes α sont synthétisées en un énorme excès par rapport aux chaînes β.

a) Etat hétérozygote

Généralement, les individus hétérozygotes simples sont des porteurs asymptomatiques.

b) Etat hétérozygote composite

Les patients atteints de sphérocytose récessive avec déficit marqué en spectrine sont très probablement des hétérozygotes composites pour des allèles α-spectrine peu ou pas exprimés. Wichterle et coll.[24]ont décrit les premiers chez un individu l'association, en *trans* l'un de l'autre, d'un allèle *null*, l'allèle α^{PRAGUE} hérité du père asymptomatique et d'un allèle faiblement exprimé, l'allèle α^{LEPRA} (Low Expression Prague) hérité de la mère (figure 8).

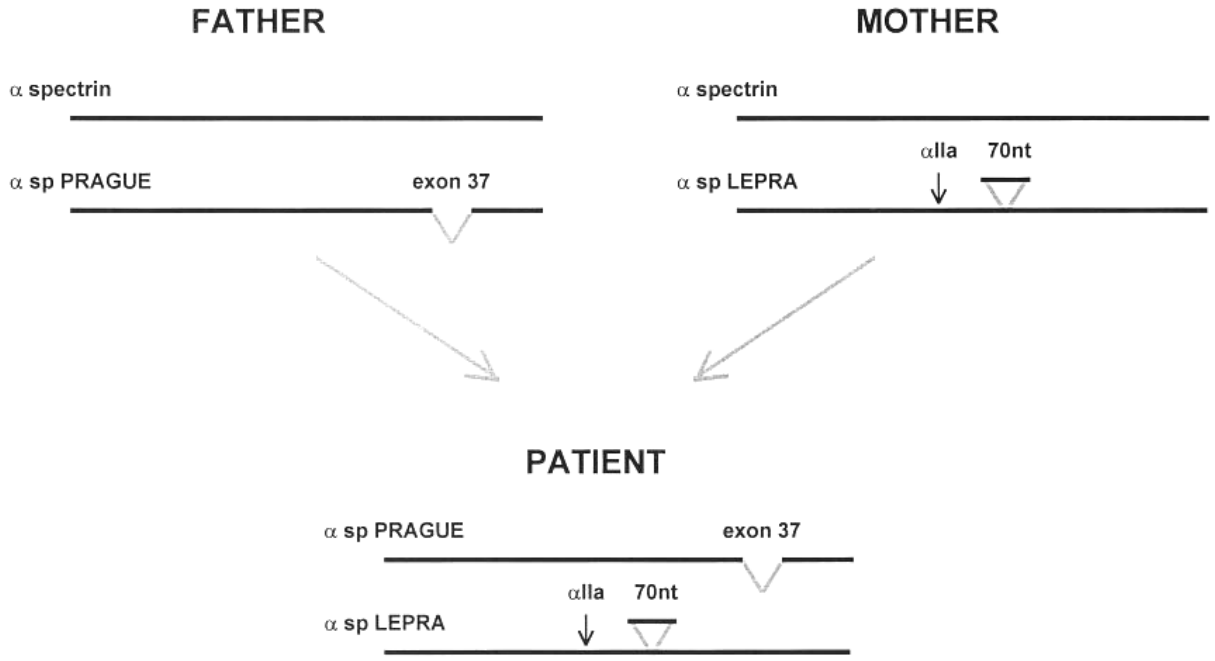


Figure 8. Schéma de transmission des deux mutations dans la famille étudiée[24]

L'allèle α^{LEPRA} est caractérisé par une mutation ponctuelle dans l'intron 30 qui aggrave l'utilisation d'un site cryptique accepteur à la position -70 de l'intron 30. Le recrutement de la fin de l'intron 30 dans l'exon 31 entraîne un décalage de la phase de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré. La chaîne α ainsi produite est incapable de participer à la constitution du squelette érythrocytaire. La spectrine LEPRA semble être présente chez environ 50 % des patients souffrant de sphérocytose héréditaire récessive. Delaunay et coll.[25] ont étudié une famille avec deux enfants atteints de sphérocytose héréditaire sévère. Les parents sont hématologiquement normaux. La mère est hétérozygote pour l'allèle α^{LEPRA}. Le père est hétérozygote pour une nouvelle combinaison dans laquelle un des deux allèles est un allèle polymorphe d'expression basse appelé α^{LELY}, tandis que l'autre allèle correspond à l'allèle α^{LELY} avec une substitution de la guanine en adénine à l'extrémité 3' de l'exon 51, nommée Bicêtre. Cette nouvelle combinaison est appelée $\alpha^{LELY\text{-}Bicêtre}$. Les enfants sont hétérozygote composite pour les allèles α^{LEPRA} et $\alpha^{LELY\text{-}Bicêtre}$. La RT-PCR détecte seulement des traces d'ARNm codant pour la spectrine $\alpha^{LELY\text{-}Bicêtre}$. La mutation est donc essentiellement une mutation *null* sans production de protéine fonctionnelle. L'absence de maladie chez le père α^{LELY} / $\alpha^{LELY\text{-}Bicêtre}$ comparée à l'hémolyse marquée chez les enfants α^{LEPRA} /$\alpha^{LELY\text{-}Bicêtre}$ montre que l'expression de l'allèle α^{LELY} n'est pas assez basse pour démasquer l'allèle *null* de l'autre chromosome. Les estimations quantitatives de cette étude suggère que pour évoquer une sphérocytose, l'expression de la chaîne α de spectrine doit être réduite d'au moins 25 % par rapport à la normale.

c) Etat homozygote

Aucun porteur homozygote n'a été rapporté chez l'homme. Par contre, il existe plusieurs souches naturelles de souris (souris *sph/sph*, sph^{2BC}/sph^{2BC}, sph^{IJ}/sph^{IJ} et sph^{ha}/sph^{ha}) qui, combinant à l'état homozygote des mutations de l'équivalent murin du gène SPTA1, présentent une sphérocytose héréditaire sévère[26].

2.2.2. Mutation du gène SPTB

20 % des cas de sphérocytose héréditaire sont dus à des mutations situées sur le gène SPTB, codant la chaîne β de la spectrine. Elles donnent des tableaux cliniques modérés à sérieux, ne nécessitant pas de transfusion en général, du moins pendant les premières années de vie. Ces mutations sont associées à des formes de sphérocytose héréditaire à transmission dominante. Ce genre de mutations a été identifié dans la plupart des familles avec une sphérocytose

héréditaire à transmission dominante en Amérique du Nord, France et Italie. Cependant, les mutations *de novo* ne sont pas rares.

Un grand nombre de mutations ont été élucidées dans le gène SPTB en comparaison au gène SPTA1. Il s'agit le plus souvent de mutations *null*, supprimant la synthèse du lot haploïde de la chaîne β correspondante. Les terminaisons prématurées de la traduction, par anomalies de l'excision des introns (spectrines Bergen, Houston, Ostrava et Philadelphia) ou par mutations non-sens (spectrines Baltimore et Tabor) qui déplacent le cadre de traduction, sont à la base de la plupart des mutations, responsables de la déstabilisation de l'ARNm et de l'instabilité du produit de transcription[27]. Dans la spectrine Promissão, une mutation du codon d'initiation de la traduction empêche la traduction du peptide[28]. Une délétion génomique de 4,6 kpb dans la spectrine Durham entraîne la formation d'un peptide tronqué qui est incapable de s'incorporer correctement dans la membrane du globule rouge[29].

Plusieurs mutations faux-sens ont été décrites. Dans la spectrine Kissimmee, une substitution du tryptophane 202 en arginine est située dans la région d'interaction avec l'actine et la protéine 4.1 et conduit à un défaut de fixation de la spectrine à la protéine 4.1, entraînant une instabilité de la spectrine[30].

D'après l'étude de Miraglia et coll.[31] chez des enfants italiens atteints de sphérocytose héréditaire avec un déficit isolé en spectrine issus de parents normaux cliniquement et hématologiquement, le mode de transmission apparemment récessif serait en fait associé à des mutations *de novo* d'un allèle β-spectrine.

Le grand potentiel pathogène de ces mutations et leur transmission dominante sont dus, probablement, au fait que la β-spectrine est synthétisée en quantité plus faible que l'α-spectrine, limitant la quantité de dimères de spectrine disponibles pour être incorporés dans le squelette membranaire. Aucun porteur homozygote ou hétérozygote composite n'a été rapporté.

2.2.3. Mutation du gène ANK1

Les mutations du gène ANK1 sont les plus fréquemment rapportées dans la sphérocytose héréditaire typique à transmission dominante dans les populations nord-européenne (50 à 60 % des cas). Elles sont responsables d'une forme cliniquement manifeste de sphérocytose héréditaire. L'association de la sphérocytose héréditaire à des anomalies du chromosome 8 est connue depuis longtemps, tout comme celle avec le déficit d'ankyrine. Les études réalisées sur des patients ont mis en évidence que, malgré la synthèse normale de la spectrine, son

incorporation dans le squelette membranaire est déficitaire, à cause d'une réduction importante de l'expression de l'ARNm de l'ankyrine. En parallèle, un cas de sphérocytose héréditaire sévère dû à la délétion complète du bras court du chromosome 8, contenant aussi le gène de l'ankyrine, a apporté la preuve directe de cette association. Le rôle essentiel joué par les formes mutantes de l'ankyrine a ensuite été mis en évidence par l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP), utilisant l'ADNc de l'ankyrine comme sonde, réalisée sur une famille nombreuse atteinte de sphérocytose héréditaire autosomale dominante. L'étude a prouvé l'existence d'une liaison statistiquement significative entre le polymorphisme de l'ankyrine et l'expression de la maladie, tandis que la liaison avec d'autres protéines du squelette et membranaires étaient non significatives[11]. L'électrophorèse des protéines membranaires montre un déficit combiné en ankyrine (tendant à être masqué par l'élévation des réticulocytes qui sont naturellement plus riches en ankyrine), en spectrine et en protéine 4.2. Le déficit de ces dernières protéines est secondaire, et témoigne de leur liaison à l'ankyrine[10]. En effet comme établi par les études de la spectrine et de l'ankyrine dans les érythroblastes, quand l'ankyrine est déficiente, la spectrine en excès, incapable de se lier à la membrane, est dégradée. En résulte un déficit en spectrine secondaire au déficit en ankyrine. Le déficit combiné en spectrine et ankyrine représente le phénotype biochimique le plus fréquent (environ 60 % des cas). Palek et coll.[32] ont montré que dans un tiers des cas, ce déficit combiné est dû à la diminution d'expression d'un allèle ANK1 causée soit par une transcription réduite du gène de l'ankyrine, soit par une instabilité des mutants ARNm. Donc l'absence dans les réticulocytes d'ARNm correspondant à un des deux allèles ANK1 est observée dans 20 % des cas de sphérocytose héréditaire.

Il est évident qu'il existe un éventail très large de défauts moléculaires. Les mutations non-sens et celles qui déplacent le cadre de lecture sont associées à la sphérocytose héréditaire à transmission dominante, tandis que les substitutions ponctuelles ou les mutations situées dans le promoteur du gène ANK1 sont associées à la sphérocytose héréditaire de transmission récessive. Cependant le gène ANK1 se prête à de fréquentes mutations *de novo*. A la première génération, elles miment un mode de transmission récessif. Lors des générations suivantes, elles se conforment au mode de transmission dominant mentionné[33]. L'accumulation de nouvelles mutations, au fil du temps, est néanmoins contrecarrée par un mécanisme (incompris), de sorte que l'incidence de la sphérocytose héréditaire liée à des mutations du gène ANK1 n'augmente pas[10]. Dans la plupart des cas les mutations du gène de l'ankyrine sont « privées », c'est-à-dire unique pour une famille donnée. Cependant, Gallagher et coll.[34]

décrivent une mutation par insertion et décalage du cadre de lecture du gène de l'ankyrine chez trois sujets atteints de sphérocytose héréditaire sévère, sans aucun lien de parenté et d'origine ethnique différente. Il s'agit de la première description d'une mutation récurrente dans le gène de l'ankyrine, appelée ankyrine Florianõpolis.

En règle générale dans la sphérocytose à transmission dominante, les mutations du gène ANK1 abolissent la synthèse du lot haploïde correspondant de l'ankyrine (survenue d'une mutation non-sens, d'un décalage de la phase de lecture ou d'une anomalie de l'épissage, entre autres). Ainsi certaines mutations codent pour des ankyrines tronquées au niveau du domaine de fixation avec la protéine bande 3 (Bari, Bugey, Duisburg, Einbeck, Marburg, Napoli I, Osterholz, Stuttgart). D'autres codent pour des ankyrines tronquées au niveau du site de fixation de la spectrine (Anzio, Napoli II, Porta Westfalica). Les ankyrines Bovenden, Saint-Etienne 1 et 2 résultent d'une terminaison prématurée au sein du domaine de régulation. Pour l'ankyrine Ravnovnik, une mutation non sens au sein du domaine de régulation provoque un déficit sélectif en protéine 2.1, principale isoforme de l'ankyrine. Les manifestations cliniques sont cantonnées à l'hématie, car l'allèle restant est capable de compenser l'allèle *null* dans d'autres types cellulaires exprimant l'ankyrine 1[10].

a) Mutations *de novo*

Un problème difficile est de faire la différence entre les mutations *de novo* et les formes de sphérocytose héréditaire à transmission récessive. Dans la sphérocytose héréditaire récessive, deux mutations identiques (homozygotes) ou non (hétérozygotes composites) doivent être présentes dans le génome du malade, et chacun de ses parents doit porter une de ces mutations, tout en étant asymptomatiques du point de vue clinique et hématologique. Plusieurs études ont montré que les parents des enfants malades présentaient les formes sauvages du gène ANK1, indication claire qu'il s'agit de mutations *de novo*, qui seront transmises de façon dominante à leurs descendants. Miraglia et coll.[35] trouvent que 63 % des enfants ayant une sphérocytose héréditaire à transmission apparemment récessive présentent en réalité une mutation *de novo*.

b) Etat hétérozygote composite

De rares cas d'hétérozygotie composite ont été rapportés dans la littérature. Dans deux familles, une mutation récurrente (substitution de la thymine en cytosine en position 108) est mise en évidence dans le promoteur. Une seconde mutation dans l'autre allèle ANK1 a été

identifiée : ankyrine Walsrode dans une famille et ankyrine Bocholt dans l'autre. Les parents hétérozygotes ne sont pas affectés. La mutation Walsrode se situe dans le site de liaison de l'ankyrine 1 pour la protéine bande 3 et entraîne une diminution de 28 % de la protéine bande 3.

c) Etat homozygote

Pendant longtemps, on a pensé que l'état homozygote ne saurait être viable car dans les tissus non hématopoïétiques, l'anomalie des deux allèles ANK1 ne laisserait plus aucune possibilité de compensation. Aux signes hématologiques s'adjoindraient des signes non hématologiques. Ainsi en va-t-il de la souche naturelle *nb/nb* à l'état homozygote, qui, en plus d'une sphérocytose grave, présente des troubles cérébelleux différés, sous-tendus par une dégénérescence des cellules de Purkinje[10]. Edelman et coll.[36] ont découvert une mutation au niveau du site accepteur d'épissage de l'exon 17 dans une famille turque grâce à une nouvelle technique DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography). Cette mutation perturbe donc l'épissage alternatif de l'ankyrine. Les parents sont hétérozygotes et le propositus est homozygote pour cette mutation. La preuve est faite que l'homozygotie pour une mutation associée à une sphérocytose héréditaire à transmission dominante liée à un déficit en ankyrine peut être compatible avec la vie.

2.2.4. Mutation du gène EPB3

a) Etat hétérozygote[8, 10]

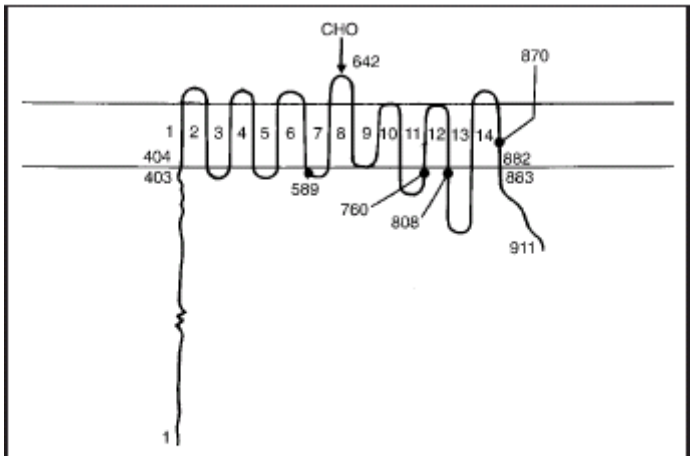
La présentation clinique est sensiblement moins prononcée que dans la forme précédente. 20 % environ des cas de sphérocytose héréditaire sont associés à un déficit partiellement compensé de la protéine bande 3. Le mode de transmission est invariablement dominant. Aucune mutation *de novo* (néanmoins possible théoriquement) n'a été décrite à ce jour. Dans la plupart des cas, le déficit en protéine bande 3 est associé à un déficit en protéine 4.2. Mais deux situations doivent être distinguées :

- soit il s'agit d'une mutation hétérozygote du gène EPB3 induisant un déficit en protéine bande 3 de 20 à 40 % en SDS-PAGE et un déficit secondaire en protéine 4.2 proportionnel au déficit en protéine bande 3 ;
- soit il s'agit d'une mutation du gène EPB3 entraînant une atteinte du site de liaison pour la protéine 4.2. Cette variété de sphérocytose héréditaire est exceptionnelle. Son mode de

transmission est récessif. Elle se signale par une réduction importante (- 50 %) de la protéine 4.2 avec une diminution minime de la protéine bande 3. Si plusieurs exemples ont été rapportés (bande 3 Tuscaloosa, Montefiore, …), un seul l'a été de manière satisfaisante (bande 3 Fukuoka[37]). La mutation causale ne se situe pas sur le gène ELB42, comme le phénotype inciterait à le penser, mais sur la partie du gène EPB3 codant le domaine cytoplasmique de la protéine bande 3. Elle modifie la position 130 (glycine en arginine), qui doit en toute logique appartenir au site de liaison de la protéine bande 3 pour la protéine 4.2. Il convient de ne pas confondre la présente variété de sphérocytose avec la forme découlant de mutations situées sur le gène ELB42 (cf. infra).

On peut identifier plusieurs types de mutations du gène EPB3 :

- Certaines abolissent la synthèse de la protéine par apparition d'un codon non-sens (bande 3 Lyon-Osnabrück 1), d'un décalage du cadre de lecture (bande 3 Foggia), ou d'une anomalie de l'épissage (bande 3 Pribam), à quelque endroit de la séquence polypeptidique que survienne l'altération.
- D'autres sont des mutations faux-sens, principalement dans le domaine membranaire de la protéine bande 3. Le simple changement d'un acide aminé suffit à interdire l'insertion du domaine membranaire, pour cause de déstabilisation. Remarquable à cet égard est la substitution des résidus arginine fortement conservés 760, 808 et 870 dont le remplacement empêche l'insertion dans la membrane de la protéine bande 3 (figure 9)[38].



3 Représentation schématique de la bande 3.
On distingue les domaines cytoplasmique (acides aminés 1 à 403) et membranaire (acides aminés 404 à 822). Le long du domaine membranaire, la bande 3 serpente 14 fois à travers la bicouche lipidique. Des boucles externes et internes assurent la continuité covalente entre les segments transmembranaires. 642 : point de branchement, au niveau d'une asparagine, de l'unique et volumineuse partie glycanique de la bande 3. 589 : mutation récurrente (Arg → Cys), responsable de l'acidose tubulaire distale rénale (forme à mode de transmission dominant). 760, 808 et 870 : arginines conservées, dont le remplacement empêche l'insertion dans la membrane de la bande 3.

Figure 9. Représentation schématique de la protéine bande 3[10]

- La lésion moléculaire est parfois plus étendue qu'une mutation faux-sens, ponctuelle : délétion (bande 3 Prague) ou addition (bande 3 Milano, Vesuvio) de plusieurs acides aminés. Les déficits en bande 3 sont bien visibles lors de l'électrophorèse des protéines membranaires. Ils vont de pair avec une diminution secondaire de la protéine 4.2, liée à la protéine bande 3.

A l'état hétérozygote, le déficit en protéine bande 3 érythrocytaire, ne s'accompagne d'aucun signe non hématologique. Le gène EPB3, néanmoins, s'exprime aussi dans les cellules intercalaires du tubule rénal distal. Si le domaine cytoplasmique, de par ses fonctions d'attache à d'autres protéines est hypertrophié dans l'hématie (acides aminés 1 à 403), dans les cellules intercalaires, son rôle de liaison est allégé. Le domaine cytoplasmique de l'isoforme locale de l'échangeur des anions y est tronqué, car la transcription débute au niveau de l'exon 4 (méthionine 66), grâce à un promoteur spécifique situé dans l'intron 3. Certaines mutations, très précisément localisées, causent à l'état hétérozygote simple (transmission dominante) une acidose rénale tubulaire distale, et notamment la mutation R598H, sans créer pour autant, de sphérocytose héréditaire. Ce fait souligne l'extrême spécialisation fonctionnelle de chaque position au sein de la chaîne polypeptidique. A noter enfin que la protéine bande 3 est le support de nombreux groupes sanguins de fréquence faible.

b) Etat hétérozygote composite

Les cas associés à un déficit en protéine bande 3 ont parfois, chez certains membres d'une famille, une présentation clinique plus prononcée. C'est qu'en *trans* de l'allèle EPB3 défectueux principal se situe un allèle faible accessoire, non exprimé à l'état hétérozygote simple. C'est le cas de l'allèle Lyon (porteur d'une mutation non-sens) qui à l'état hétérozygote simple est responsable d'une sphérocytose bénigne. Mais quand l'allèle Genas, silencieux à l'état hétérozygote simple, est en *trans* de celui-ci, la sphérocytose est aggravée et le déficit en protéine bande 3 plus prononcé[39]. Il en est de même quand l'allèle Coimbra est en *trans* de l'allèle Mondego[40].

c) Etat homozygote

Pendant longtemps, on a pensé que l'état homozygote ne saurait être viable, eu égard au rôle mécanique majeur que joue la protéine bande 3. Cependant, chez l'homme, trois cas homozygotes ont été rapportés :

- La protéine bande 3 Coimbra[41] a été le premier cas d'homozygotie décrit. Elle résulte d'une mutation au début du quatrième domaine transmembranaire. L'insertion du quatrième domaine transmembranaire est une condition préalable à l'incorporation des domaines transmembranaires 1 à 3. Donc la protéine bande 3 Coimbra entraîne un défaut d'insertion membranaire. En plus, une isoforme tronquée en N-terminale existe dans les cellules intercalaires du tubule rénal, responsable d'une acidose rénale tubulaire distale.

- La protéine bande 3 Neapolis[42] provient d'une anomalie de l'épissage due au remplacement d'une thymidine par une cytosine en position 2 au niveau de l'intron 2. Cette anomalie de l'épissage aboutit à la synthèse d'une protéine tronquée qui ne pourra être tyrosine phosphorylée. Il n'y a pas d'acidose rénale tubulaire associée parce que la mutation siège en amont de l'intron 3 (qui contient un promoteur *Kidney-specific*), et ne perturbe donc pas la synthèse de l'isoforme rénale de l'échangeur d'anions.

- Delaunay et coll.[8] sont en train d'étudier le cas d'un enfant d'origine algérienne qui présente encore une autre mutation de la protéine bande 3. La fréquence des transfusions a conduit à une splénectomie sub-totale à l'âge de 9 mois.

L'homozygotie provoque un *hydrops fetalis*, une sphérocytose gravissime et, le cas échéant, une acidose rénale tubulaire distale. Des traitements lourds (réanimation post-natale, transfusions massives), éventuellement complétés par un apport de bicarbonates (acidose rénale tubulaire distale), permettent au nouveau-né de survivre. L'avenir est cependant hypothéqué par une rapide surcharge martiale et la nécessité d'une splénectomie précoce. Une greffe de moelle sera logiquement proposée. Le recul manque à propos de ces cas pour tirer des conclusions fermes, notamment en ce qui concerne l'indication d'un diagnostic anténatal.

2.2.5. Mutations du gène ELB42

Les cas de sphérocytose héréditaire due à des mutations du gène ELB42, codant la protéine 4.2, sont rares. Ils se manifestent, de façon assez homogène, par une anémie hémolytique compensée et par une absence totale de protéine 4.2 sans diminution détectable de la protéine bande 3. Tous les cas rapportés de mutations du gène ELB42 sont homozygotes avec des parents cliniquement silencieux, suggérant un mode de transmission récessif.

A l'exception de deux formes (protéine 4.2 Lisboa et Notame) qui impliquent soit un changement du cadre de traduction, soit un épissage alternatif d'un intron, il s'agit de simples mutations ponctuelles ou de substitution, ce qui indique une très grande susceptibilité de la conformation spatiale de la protéine 4.2 à une séquence correcte en acides aminés. Ces altérations mènent moins à la perte des capacités fonctionnelles d'interaction avec la protéine bande 3, qu'à une susceptibilité accrue à l'attaque des protéases[11].

Gallagher et Forget[43] ont rassemblé sept mutations décrites dans la littérature. Depuis, d'autres mutations ont été décrites comme la protéine 4.2 Nancy et Hammersmith.

La protéine 4.2 Nippon est une mutation courante au Japon avec une fréquence de l'ordre de 3 %. Elle résulte d'une mutation faux-sens et provoque une anémie hémolytique légère chez les individus homozygotes ou chez les hétérozygotes composites avec un second allèle muté (protéines 4.2 Fukuoka, Notame ou Shiga). Les deux seules mutations non décrites dans la population nippone sont les protéines 4 .2 Tozeur et Lisboa, trouvé respectivement chez un patient tunisien et un patient portugais[19].

L'absence de protéine 4.2, appartenant au « complexe bande 3 », entraîne une diminution secondaire du CD47, appartenant au « complexe Rh »[8].

3. Physiopathologie de la sphérocytose héréditaire

Au cours de sa vie dans la circulation, le globule rouge accomplit, pendant 120 jours, la tâche indispensable de livraison de l'oxygène aux tissus. Pour accomplir cette mission, il doit traverser des obstacles, en particulier des micro-capillaires ou des pores de sinus vasculaires qui lui imposent de passer par des détroits et des labyrinthes dont le diamètre est très inférieur au sien : le diamètre du globule rouge est de 7 microns mais il peut traverser des pores de 1, voire 0,5 microns (figure 10).

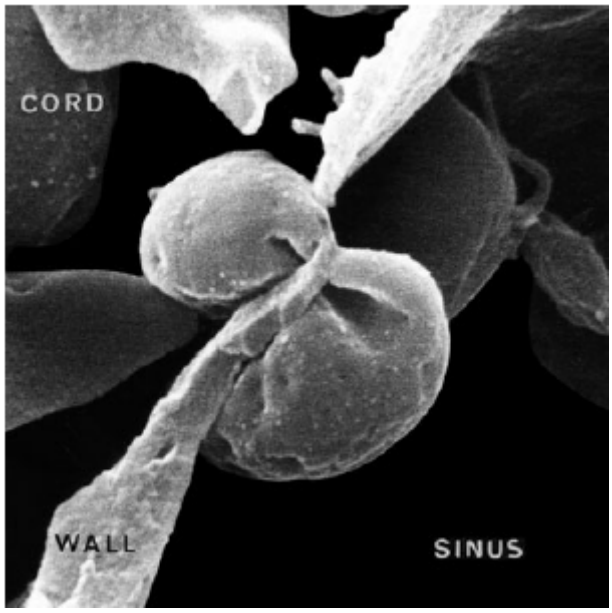


Figure 10. Passage d'un globule rouge normal d'un cordon splénique vers un sinus veineux à travers un passage très étroit dans la rate[13]

Cette adaptation à la microcirculation, essentielle pour assurer la survie cellulaire, n'est possible pour le globule rouge que grâce à des propriétés physiques très particulières : déformabilité et élasticité, qui lui permettent de se déformer lors de la traversée des obstacles et de retrouver, dès que s'arrêtent les contraintes, sa forme de disque biconcave.

Le globule rouge est un sac dont le contenu, l'hémoglobine, est fluide. Le sac lui-même a un rapport surface/volume très important qui permet une déformabilité optimale (un ballon mal gonflé se déforme mieux qu'un ballon bien gonflé), et une membrane déformable et élastique. Toute atteinte de ce système : augmentation de la concentration en hémoglobine, diminution

du rapport surface/volume par perte de surface, rigidité membranaire, se solde par une diminution de la déformabilité des érythrocytes et leur destruction prématuré au sein des lieux de ralentissement et de contraintes physiques, principalement la rate[44].

3.1. Perte de surface membranaire par microvésiculation[45]

Dans la sphérocytose héréditaire, les globules rouges sont caractérisés par une diminution de leur déformabilité et de leur rapport surface/volume due à une perte de surface sous la forme de microvésicules, comme cela a été montré par microscopie électronique (figure 11)[46].

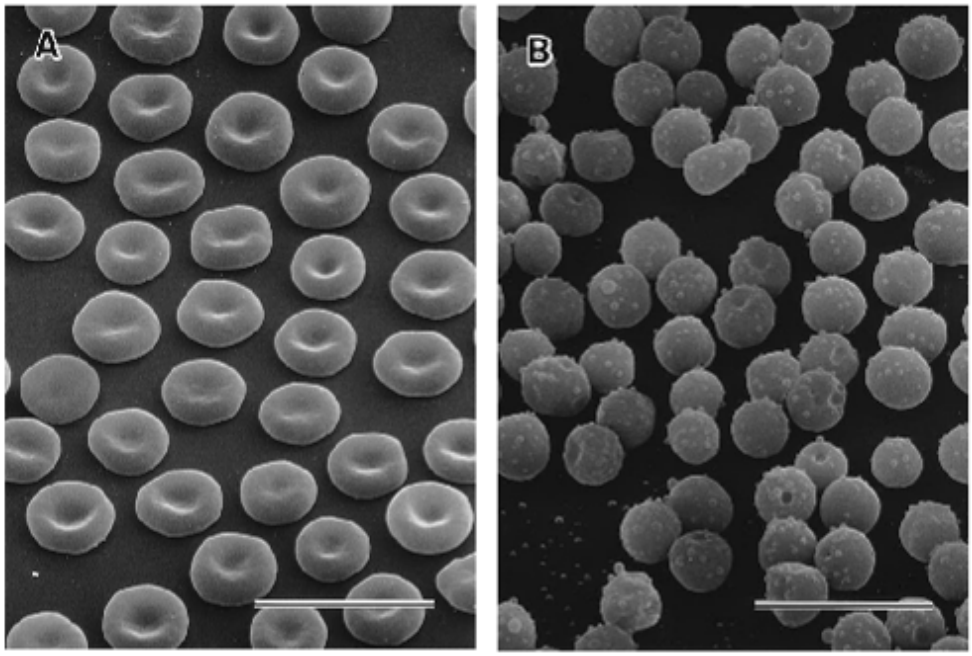


Figure 11. Observation au microscope à balayage électronique des globules rouges d'un sujet sain (A) et d'un sujet atteint de sphérocytose héréditaire (B) [46]

Les hématies perdent leur forme biconcave et deviennent des sphérocytes.

Les mécanismes menant à la perte de matériel membranaire dans la sphérocytose héréditaire ne sont pas encore tous élucidés. Deux hypothèses ont été avancées :

- La première est basée sur l'idée que la bicouche lipidique est principalement stabilisée par ses interactions avec le squelette sous-jacent. L'anomalie de la membrane dans la sphérocytose héréditaire a pour conséquence une déstabilisation de la bicouche lipidique et une perte de surface par microvésiculation.
- La seconde hypothèse affirme que la bicouche lipidique est principalement stabilisée par la fonction d'ancrage des lipides par la protéine bande 3. Ainsi lorsque la protéine bande 3 est absente de la membrane, les lipides non ancrés sont

perdus. Tandis que dans les déficits en protéine du squelette, la déstabilisation du réseau sous-jacent lié à la bicouche lipidique par les molécules de protéine bande 3 entraîne une diffusion, une augmentation de la mobilité latérale et une agrégation passagère de ces molécules facilitant la vésiculation. Ces agrégats de protéines bande 3 activeraient l'érythrophagocytose.

Il est généralement admis que la sphérocytose héréditaire est caractérisée par une hétérogénéité clinique, biologique et génétique. Quels sont les paramètres de cette variabilité au niveau cellulaire ? Un déficit protéique primaire dans la sphérocytose héréditaire peut survenir isolément ou il peut entraîner secondairement des déficits en une ou plusieurs protéines, détectés par électrophorèse. Par exemple, dans le déficit en ankyrine, une réticulocytose associée masque le déficit protéique primaire, et seul le déficit secondaire en spectrine et parfois aussi en protéine 4.2 est apparent sur l'électrophorèse. Des études récentes soutiennent la notion que le type et l'importance de ces déficits protéiques secondaires sont impliqués dans le pronostic hématologique et clinique de la maladie. Un déséquilibre du rapport entre les déficits primaires et secondaires peut expliquer une augmentation de la déstabilisation de la membrane érythrocytaire. Rocha et coll.[47] ont mis en évidence une corrélation négative significative entre l'équilibre de ce rapport et la sévérité de la maladie.

Une mutation génétique entraîne soit une diminution de la synthèse d'ARNm, soit la synthèse d'une protéine anormale. Dans le premier cas, la diminution de la synthèse protéique entraîne un déficit membranaire de cette protéine, et probablement des protéines en interaction par manque de sites de liaison. Des déficits protéiques équivalents sont observés et il n'y a pas de défaut d'interactions entre les protéines. Alors que, lorsqu'une protéine anormale est synthétisée, il y a probablement un défaut de liaison avec les autres protéines membranaires qui entraîne une incorporation réduite de ces protéines dans la membrane et, donc, à un déficit plus important, reflété par un déséquilibre entre les déficits protéiques primaires et secondaires. Par conséquent, l'instabilité membranaire est augmentée conduisant à une forme sévère de la maladie. Il semble logique qu'un sphérocyte présentant des interactions normales entre les protéines membranaires soit plus résistant qu'un sphérocyte présentant une altération de ces interactions.

3.2. Interactions entre la rate et le sphérocyte

Du point de vue histologique, la rate possède une circulation dite « ouverte » dans laquelle le sang artériel se déverse dans des cordons spléniques, véritable labyrinthe constitué de passages très étroits formés par des cellules réticulées et tapissées de phagocytes. Normalement la plupart des cellules sanguines entrant dans ce labyrinthe vont le traverser, cependant en utilisant des chemins assez directs. Dans des situations pathologiques, les cellules sont redirigées dans une portion plus profonde de ces cordons où le flux sanguin est plus faible. Les cellules vont alors stagner plusieurs minutes, voire plusieurs heures. Les cellules sanguines vont ensuite rejoindre la circulation veineuse en passant à travers des espaces situés entre les cellules endothéliales constituant les sinus veineux. Ces espaces sont souvent plus petits que les globules rouges qui doivent donc être capables de se déformer pour passer (figure 10). Les sphérocytes ayant perdu ces capacités de déformabilité sont particulièrement gênés à ce niveau et vont donc être séquestrés dans la rate.

Chez les patients présentant une sphérocytose héréditaire, on distingue sur les frottis sanguins de sang périphérique deux populations de cellules : une population minoritaire de microsphérocytes de fragilité osmotique très grande et une population majoritaire dont la fragilité osmotique est à peine plus élevée que la normale. Certains auteurs ont d'ailleurs montré que cette population minoritaire provient de la rate. La rate semble en effet être un protagoniste actif dans la physiopathologie de la sphérocytose héréditaire et non un filtre passif. En effet, après splénectomie, bien que la sphérocytose persiste, cette population hyperfragile disparaît. La rate semble donc augmenter le caractère splénique des sphérocytes et donc leur fragilité.

Par ailleurs, l'environnement existant dans les cordons spléniques ne crée pas des conditions métaboliques favorables à la survie des sphérocytes (pauvreté en glucose, milieu acide inhibant les enzymes glycolytiques). Enfin, il se produit un gonflement des cellules en raison d'une entrée de chlore et d'eau. Ainsi le sphérocyte détenu dans les cordons spléniques en raison d'une diminution de surface, va être soumis à l'érythrostasis dans un environnement métabolique défavorable.

3.3. Erythrostasis

Les sphérocytes sont particulièrement sensibles à l'érythrostasis. Les phénomènes se produisant dans le globule rouge normal et le sphérocyte sont les mêmes, mais du fait de son

caractère instable, le sphérocyte sera détruit beaucoup plus rapidement. A l'état normal, le globule rouge ne contient qu'une petite quantité de sodium et des quantités beaucoup plus importantes de potassium. Le sodium considérablement plus concentré dans le plasma sanguin tend à pénétrer passivement à l'intérieur du globule rouge en y entraînant de l'eau. Une pompe à sodium, ATP dépendante, assure son expulsion active avec une quantité d'eau correspondante, ce qui permet au globule rouge de garder sa forme de disque biconcave. Le fonctionnement de cette pompe exige un apport suffisant de glucose et d'oxygène, un métabolisme glucidique intra-érythrocytaire normal et une quantité suffisante d'ATP. Dans la sphérocytose héréditaire, les hématies porteuses d'anomalies membranaires sont une première fois mises en péril en raison d'une augmentation modérée de leur perméabilité au sodium. Les cellules vont alors prendre l'aspect d'une sphère. Cette propension à accumuler le sodium et l'eau est normalement compensée par une pompe à sodium ATP-dépendante afin d'éviter la lyse. Mais lorsque tout le glucose contenu dans la cellule est utilisé ; la cellule est déplétée en ATP, la pompe ne fonctionne plus et sa teneur en sodium et en eau augmente. Malgré cela, le gain en sodium n'est pas suffisant pour expliquer à lui seul l'hémolyse du sphérocyte. Par contre, il est responsable en association à la perte des lipides membranaires du phénomène d'auto-hémolyse.

Cependant, il semble que la durée de séjour des sphérocytes dans les cordons spléniques ne soit pas suffisamment longue pour expliquer leur hémolyse par les conditions métaboliques défavorables et l'érythrostasis. En effet, un certain nombre de sphérocytes est remis en circulation après passage splénique et va donc passer plusieurs fois dans la rate.

3.4. Dynamique splénique

Lors de leur stase dans les cordons spléniques, les sphérocytes sont modérément déplétés en ATP de façon irréversible, ce qui après de multiples passages spléniques, résultera en une séquestration et lyse cellulaire. Par ailleurs, les sphérocytes, et particulièrement la spectrine au niveau de sa liaison avec la protéine 4.1, sont très sensibles aux agents oxydants présents en grande quantité dans la rate[48].

Enfin le rôle des macrophages a également été suspecté dans la lyse des sphérocytes. En effet, certaines expériences ont démontré que les macrophages étaient capables de fixer les cellules exprimant les phosphatidylsérines à leur surface. Ces lipides, habituellement situés au niveau de la face interne de la bicouche lipidique, peuvent se retrouver au niveau de la face externe en cas d'exposition à des agents oxydants ou de déficit en spectrine.

3.5. Mécanisme compensateur de l'hémolyse[49]

Physiologiquement, l'érythropoïèse contrebalance la disparition des globules rouges âgés. Environ 1 % des globules rouges circulants sont détruits quotidiennement et remplacés par les réticulocytes. L'EPO est le principal facteur de croissance responsable de la régulation de la production de globules rouges.

Le principal stimulus augmentant la synthèse d'EPO est l'hypoxie tissulaire. En induisant l'expression du gène EPO et donc la synthèse d'EPO, l'hypoxie entraîne une augmentation des taux plasmatiques d'EPO. Dans la moelle osseuse, les précurseurs des érythroblastes (BFU-E et CFU-E) présentent des récepteurs spécifiques à l'EPO à leur surface. Quand l'EPO se lie à ses récepteurs, ces précurseurs prolifèrent et subissent une maturation en érythroblastes et enfin en réticulocytes.

Les patients présentant une forme bénigne de sphérocytose héréditaire sont capables de maintenir une concentration en hémoglobine normale en dépit de l'hémolyse. Ceci s'explique par l'augmentation physiologique de la synthèse d'EPO et une réponse efficace de l'érythropoïèse. Cependant dans les formes modérées ou sévères de la maladie, une anémie s'installe impliquant une perturbation de ces mécanismes physiologiques malgré une surproduction d'EPO. Dans la sphérocytose héréditaire, l'activation macrophagique pourrait être impliquée dans l'inhibition de la synthèse d'EPO et/ou de la réponse à l'EPO. Une autre explication possible de l'inhibition de la réponse à l'EPO pourrait impliquer les récepteurs à l'EPO qui pourraient être manquants ou présenter un signal de transduction affaibli. Les cytokines de l'inflammation pourraient aussi être impliquées.

L'étude de Rocha et coll.[49] a cherché un lien entre les taux d'EPO et le type d'anomalie membranaire impliquée. Ainsi ils supputent que dans les déficits en protéine bande 3, une inhibition de la synthèse d'EPO serait plutôt impliquée avec des taux d'EPO plus bas. Alors que dans les autres déficits, il s'agirait d'une inhibition de la réponse à l'EPO, avec des taux d'EPO plus élevés.

Ces auteurs ont également montré que les taux d'EPO sont corrigés après splénectomie, alors que la numération des réticulocytes reste dans des valeurs hautes. La splénectomie, en réduisant la destruction des globules rouges et, donc, l'activation macrophagique semble permettre, par la suite, une réponse appropriée à l'EPO[49].

4. Formes cliniques, évolution et complications de la sphérocytose héréditaire

4.1. Circonstances de découverte

Le diagnostic de sphérocytose héréditaire est le plus souvent réalisé au cours de l'enfance ou chez l'adulte jeune. Toutefois, la maladie peut rester méconnue et être diagnostiquée tardivement, quelques fois même à un âge très avancé[50]. La maladie peut parfois être découverte au cours d'une enquête familiale parce qu'un membre de la famille est atteint. Ou bien il peut s'agir d'une découverte fortuite à l'occasion d'un bilan biologique. En effet l'hémolyse peut être chroniquement compensée par une érythropoïèse accrue sans qu'existe d'anémie franche.

Une lithiase biliaire pigmentaire peut également être révélatrice : il s'agit d'une complication fréquente des anémies hémolytiques constitutionnelles et ce diagnostic doit être évoqué devant une lithiase biliaire du sujet jeune.

Enfin, la maladie peut être révélée par une anémie sévère résultant de deux mécanismes périphérique et central, lorsque survient une érythroblastopénie le plus souvent liée à une primo-infection par le parvovirus B19, parfois par un autre virus. La compensation par l'érythropoïèse accrue est alors transitoirement supprimée, ce qui aggrave très brutalement l'anémie[51].

Pendant la grossesse, quelques patientes non splénectomisées peuvent présenter une anémie suffisamment sévère pour justifier une transfusion sanguine[52 53].

4.2. Histoire naturelle de la maladie

L'expression clinique de la maladie est très variable. Elle peut être asymptomatique ou, à l'extrême, il peut s'agir d'une anémie exigeant des transfusions régulières ou plus rarement d'un anasarque foetoplacentaire et une mort foetale[54]. Les signes cliniques sont peu spécifiques : souvent, il existe une symptomatologie classique d'anémie hémolytique avec pâleur, ictère ou subictère, et splénomégalie.

4.2.1. Au cours de la première année de vie

Une étude italienne[55] sur une cohorte de 468 sujets montre que la maladie était cliniquement évidente pendant la période néonatale dans 65 % des cas. L'ictère était présent dans la plupart des cas, nécessitant une photothérapie pour contrôler l'hyperbilirubinémie voire une exsanguino-transfusion. L'anémie était présente dans 44 % des cas, deux tiers de ces patients nécessitant une transfusion sanguine.

a) L'ictère

L'ictère est le signe le plus fréquent pendant le premier mois de vie. Dans une étude récente de Tchernia et coll.[56] qui a consisté en la recherche systématique d'une sphérocytose héréditaire dans une population de 400 nouveaux-nés ictériques, le diagnostic a été positif dans 1% des cas, soit 20 à 50 fois plus que dans la population générale.

L'ictère est dû à l'hémolyse des sphérocytes et la capacité réduite du foie du nouveau-né à conjuguer la bilirubine. Il en résulte une augmentation rapide des concentrations de bilirubine libre dans le sang avec un risque accru d'ictère nucléaire[21].

Récemment, il a été prouvé qu'une homozygotie pour le gène de la maladie de Gilbert (UDP1) pourrait aggraver l'ictère des nouveaux-nés atteints de sphérocytose héréditaire[57].

b) L'anémie hémolytique[58]

Elle est plus fréquente au-delà d'un mois de vie. Le taux d'hémoglobine est en général normal à la naissance, mais va diminuer dès les premiers jours de vie.

La destruction accrue des globules rouges et la réponse de l'érythropoïèse pour compenser cette destruction sont les deux mécanismes qui déterminent la sévérité clinique des anémies hémolytiques chroniques. A la naissance et durant le premier mois de vie, ces deux mécanismes subissent des modifications très importantes. D'un côté, la circulation splénique est pleinement achevée seulement après la naissance, entraînant une destruction périphérique accrue des globules rouges anormaux tels que les sphérocytes. Par conséquent, l'hémolyse, qui est probablement quiescente ou légère chez le fœtus affecté de sphérocytose héréditaire (sauf dans les formes très sévères de la maladie), augmente dramatiquement après la naissance quand les fonctions de filtre et de phagocytose de la rate deviennent entièrement efficaces. D'un autre côté, l'érythropoïèse, qui est très stimulée pendant la vie fœtale, entre brusquement dans une phase d'hypoplasie un peu après la naissance. Le principal mécanisme physiologique responsable de la réduction de l'érythropoïèse est une diminution très importante de la sécrétion d'érythropoïétine. Cette diminution de sécrétion est sans doute due

au passage d'une sécrétion d'érythropoïétine hépatique à une sécrétion rénale et à la forte élévation du taux d'oxygène lors du passage d'une respiration fœtale à une respiration pulmonaire. Un nouveau-né atteint de sphérocytose héréditaire doit donc faire face à un taux d'hémolyse accru et à une réponse de son érythropoïèse inappropriée. Tout ceci aboutit donc à une aggravation de l'anémie au cours de la première année de vie et fréquemment à un besoin en transfusions sanguines. Vers l'âge de un an, l'hémolyse chronique est bien compensée et il n'y a plus de besoin transfusionnel dans la majorité des cas.

c) Evolution[21]

La présence de symptômes à la naissance n'est pas strictement prédictive de la forme à l'âge adulte. Néanmoins, dans 100 % des cas sévères étaient observés des symptômes de la maladie à la naissance, tandis que seulement 20 % des adultes atteints de forme légère avaient des symptômes à la naissance. Donc le risque relatif pour un nouveau-né présentant des manifestations néonatales de sphérocytose héréditaire de développer plus tard une forme sévère est deux fois supérieur à celui de la population générale atteinte de sphérocytose héréditaire (10 % versus 5 %).

En conclusion, bien que rare, la sphérocytose héréditaire doit être évoquée devant tout ictère et/ou anémie d'origine hémolytique, et après élimination d'une incompatibilité érythrocytaire foeto-maternelle, notamment en présence d'antécédents familiaux d'ictère, de splénomégalie, de splénectomie ou de diagnostic connu de sphérocytose héréditaire. Révélée chez le nouveau-né, aucun élément ne permet de prédire le pronostic ultérieur.

4.2.2. Les différentes formes cliniques chez l'enfant de plus de un an et l'adulte

a) Classification de la sphérocytose héréditaire

La maladie présente un large spectre clinique habituellement classé en trois formes : bénigne, typique ou modérée et sévère, d'après la clinique et les examens biologiques (tableau 3).

NB : la fragilité osmotique avant et après incubation est considérée comme modérément augmentée si une ou deux des valeurs mesurées (hémolyse 1%, hémolyse 50%, hémolyse 100%) sont supérieures à la valeur normale. Si les trois valeurs sont en dehors des valeurs normales, la fragilité osmotique est désignée comme franchement augmentée.

Classification	Trait	Forme bénigne	Forme modérée typique	Forme sévère
Taux d'hémoglobine (g/dL)	normal	11-15	8-12	6-8
Taux de réticulocytes (%)	normal (<3)	3-6	> 6	> 10
Concentration en bilirubine (µmol/L)	< 17	17-34	> 34	> 51
Taux de spectrine par érythrocyte (% de la normale)	100	80-100	50-80	40-60
Fragilité osmotique avant incubation	normale	normale ou modérément augmentée	franchement augmentée	franchement augmentée
Fragilité osmotique après 24 h d'incubation	modérément augmenté	franchement augmentée	franchement augmentée	franchement augmentée
Splénectomie	non requise	habituellement non nécessaire pendant l'enfance et l'adolescence	nécessaire avant la puberté	nécessaire avant l'âge de 6 ans si possible

Tableau 3. Classification de la sphérocytose et indications pour la splénectomie d'après Eber et al[59]

- « Traits sphérocytaires »

Ces formes sont découvertes de manière fortuite à l'occasion d'une enquête familiale lorsqu'un des membres de la famille présente une sphérocytose héréditaire. Le plus souvent ces formes demeurent ignorées.
Ces patients doivent être considérés comme des porteurs silencieux. Ils ne sont pas authentiquement normaux puisqu'une batterie d'analyses pourrait détecter cette anomalie.

- Les formes bénignes

Elles représentent 20 à 30 % des cas. L'hémolyse chronique est complètement compensée par l'érythropoïèse. La maladie peut donc rester inaperçue pendant de longues années et se révéler à l'occasion d'une infection virale (le plus souvent par le parvovirus B19) ou d'une grossesse ou bien devant l'apparition de complications comme une lithiase biliaire.

- Les formes typiques

Elles représentent 50 à 60 % des cas. Cette forme est caractérisée par une hémolyse non complètement compensée avec une anémie légère à modérée et un recours à la transfusion de manière sporadique. Cette forme se manifeste habituellement dans la petite enfance par un ictère, une anémie et une splénomégalie. Ces patients doivent bénéficier d'une splénectomie, de préférence avant la puberté.

- Les formes sévères

Elles touchent 5 à 7 % des patients atteints de sphérocytose héréditaire. Le principal signe clinique est une anémie sévère nécessitant des transfusions itératives jusqu'à la splénectomie. Ces patients présentent une réponse partielle à la splénectomie car un degré considérable d'hémolyse persiste.

b) Hétérogénéité clinique

- Hétérogénéité clinique interfamiliale

  Les mécanismes expliquant l'hétérogénéité clinique interfamiliale sont encore mal élucidés. La même anomalie membranaire peut s'exprimer cliniquement différemment. Récemment, Rocha et coll.[49] ont montré l'importance d'une interaction équilibrée entre les protéines membranaires dans l'expression clinique de la maladie.

Certains auteurs ont rapporté une relation entre la sévérité clinique de la sphérocytose héréditaire et des anomalies membranaires spécifiques[21].

- Hétérogénéité clinique intrafamiliale

  La sévérité de la maladie est relativement uniforme à l'intérieur d'une même famille lorsque l'anomalie est transmise de manière autosomique dominante[21]. Cependant des différences d'expression clinique à l'intérieur d'une famille donnée ont été décrites.

  Elle a été imputée à une combinaison hétérozygote d'allèles, un allèle commun et un allèle faible. Ces sujets sont dits hétérozygotes composites. Des cas ont été décrits chez des patients atteints de déficits isolés en spectrine[24-25] ou en protéine bande 3[39-40].

  La présence d'un autre défaut touchant les globules rouges pourrait accentuer ou au contraire réduire l'aspect phénotypique de la sphérocytose, ce qui pourrait aussi expliquer l'hétérogénéité intrafamiliale. La famille d'un sujet atteint d'une sphérocytose héréditaire due à un déficit en protéine bande 3 associée à un trait β-thalassémique a été étudiée en Italie, il y a quelques années[60]. Deux sujets atteints de sphérocytose héréditaire seule présentaient une forme clinique typique de la maladie, alors que le propositus n'était pas anémique et montrait une petite hémolyse bien compensée. Donc le trait β-thalassémique masque la plupart des signes cliniques associés au déficit en protéine bande 3. L'association d'un trait drépanocytaire avec une sphérocytose héréditaire a été rapportée chez quelques patients [4 ; 61]. La séquestration splénique des sphérocytes s'ajoutant à la polymérisation de l'hémoglobine S favoriserait la survenue d'infarctus splénique.

De plus la sévérité de la maladie est étroitement liée avec la sévérité de l'hémolyse et de la splénomégalie.

4.3. Evolution et complications

Les patients atteints de sphérocytose héréditaire sont sujets à diverses complications : crises aplasiques, maladie biliaire, hémochromatose et plus rarement hématopoïèse extra-médullaire. La plupart de ces complications sont dues à l'hyperplasie érythroïde, conséquence de l'hémolyse chronique. Ces complications touchent aussi les sujets avec des taux d'hémoglobine normaux.

4.3.1. Erythroblastopénie

Le parvovirus B19 est le plus souvent incriminé. L'érythroblastopénie induite par le parvovirus B19 est due à une affinité particulière de ce virus pour les précurseurs de la lignée rouge. Cette affinité vient de l'expression préférentielle du récepteur membranaire du parvovirus B19, appelé globoside (glycosphingolipide neutre), par les progéniteurs érythrocytaires et les érythroblastes. Le globoside est aussi connu comme l'antigène P du groupe sanguin, dont l'expression est extrêmement commune, représentant près de 100 % des individus dans toutes les ethnies étudiées. La réplication virale s'effectue dans les cellules en division envers lesquelles ce virus présente une activité cytolytique directe. Le parvovirus B19 est capable d'inhiber la prolifération des précurseurs érythrocytaires *in vitro*, ce qui le rend responsable d'une anémie aiguë profonde *in vivo* chez les patients ayant un haut niveau de renouvellement de la lignée rouge. Une apoptose des progéniteurs érythrocytaires passant par l'activation du TNF-α serait un mécanisme cytolytique également utilisé par ce virus. La sortie d'érythroblastopénie survient habituellement entre le 7^{e} et le 14^{e} jour. Une discrète leucopénie et une thrombopénie peuvent être transitoirement observées. L'infection par le parvovirus B19 entraînant la production d'anticorps protecteurs et une immunité durable, les patients sont protégés et n'ont pas de nouvelle crise d'érythroblastopénie au cours de leur existence[62].

D'autres infections virales (CMV[63]par exemple) peuvent entraîner des crises hémolytiques, avec de manière transitoire, un ictère, une splénomégalie, une anémie et une réticulocytose plus intenses.

4.3.2. Lithiases biliaires

Les lithiases biliaires sont les complications les plus fréquentes dans la sphérocytose héréditaire. Dans l'étude de Pinto et coll.[55], environ 25 % des patients avaient des lithiases mais ce chiffre est sous-estimé car seuls les patients symptomatiques ont bénéficié d'un contrôle ultrasonographique des voies biliaires. Une étude rétrospective chez des adultes atteints de sphérocytose héréditaire a par ailleurs montré une incidence de 37 à 43 % de lithiases détectables par ultrasonographie[64]. Ces auteurs, du fait de l'incidence élevée, préconisent donc une ultrasonographie biliaire annuelle précoce. Chez les patients présentant un syndrome de Gilbert en plus, un suivi encore plus rapproché semble être indiqué. En effet, il a été démontré une augmentation par cinq du risque de formations de lithiases biliaires chez

les patients atteints à la fois de sphérocytose héréditaire et de syndrome de Gilbert[65]. La formation des lithiases biliaires dans la sphérocytose héréditaire repose sur la concentration élevée en bilirubine libre qui va se polymériser et se lier au calcium pour former du bilirubinate de calcium dans les canaux biliaires. Le syndrome de Gilbert est caractérisé par une hyperbilirubinémie principalement non conjuguée due à un déficit partiel en uridine diphosphate-glucuronyl transférase (UGT1A1) hépatique. La mutation a été récemment caractérisée : elle porte sur le gène promoteur de l'enzyme. La transmission est autosomique et récessive : les patients sont homozygotes pour la mutation. La fréquence du gène muté dans la population est de 40%. La fréquence des homozygotes est de 16% : la majorité d'entre eux ont une bilirubinémie normale. Un facteur supplémentaire est nécessaire pour induire une hyperbilirubinémie comme une hyperhémolyse. L'association de l'hyperbilirubinémie due à l'hémolyse et de la diminution de la conjugaison hépatique de la bilirubine augmente donc le risque de formation de lithiases biliaires. Bien que des études complémentaires soient nécessaires, l'évaluation du génotype UGT1A1 semble être utile dans la prise en charge de ce type de patients.

4.3.3. Hémochromatose

Cette complication a été rapportée chez un certain nombre d'adultes atteints de sphérocytose héréditaire non splénectomisés ou splénectomisés tardivement en l'absence de transfusions sanguines ou de supplémentation en fer. Un génotype hétérozygote pour la mutation responsable de l'hémochromatose a alors été incriminé[66].

4.3.4. Hématopoïèse extra-médullaire[67]

C'est une complication rare, qui est caractérisée par l'apparition de tissu hématopoïétique en dehors de la moelle osseuse, le plus souvent au niveau de la rate et du foie.

5. Diagnostic biologique de la sphérocytose héréditaire

Le diagnostic de la sphérocytose héréditaire est en général aisé lorsqu'il existe des antécédents familiaux, des signes cliniques évidents (pâleur, ictère, splénomégalie) et des examens biologiques simples sans ambiguïté révélant une anémie régénérative avec signes d'hémolyse, élévation de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), présence de sphérocytes sur le frottis sanguin et diminution de la résistance osmotique. Le diagnostic peut être plus difficile en l'absence d'histoire familiale (25 % des cas), lorsque la résistance osmotique est normale (34 % des cas), ou encore, quand une anémie sévère par érythroblastopénie aiguë liée à une infection par le parvovirus B19 révèle la maladie, ou lorsqu'une carence empêche la régénération.

Le diagnostic de sphérocytose héréditaire peut être fait à tout âge y compris en période néonatale dès le jour de la naissance sur le sang du cordon à condition de comparer les résultats à des valeurs normales de nouveaux-nés sains[68].

5.1. Critères diagnostiques simples permettant d'évoquer le diagnostic de sphérocytose héréditaire (tableau 4)

Paramètres cliniques	Pâleur, splénomégalie, ictère inconstants
Paramètres biologiques et indices érythrocytaires	↓ Hb, ↑ CCMH, ↑ % cellules hyperdenses, ↑ réticulocytes, ↓ VGMr
Frottis sanguin	Sphérocytes (peuvent être absents)
Signes d'hémolyse	↑ bilirubine libre, ↓ haptoglobine, ↑ réticulocytes
Test de Coombs érythrocytaire	négatif

Tableau 4. Critères diagnostiques simples permettant d'évoquer le diagnostic de sphérocytose héréditaire[68].

5.1.1. Hémogramme et indices érythrocytaires

La sphérocytose héréditaire est une anémie hémolytique. Cependant l'anémie n'est pas toujours présente car elle est compensée dans 40 % des cas. Habituellement, il existe une réticulocytose inversement proportionnelle à l'anémie. La réticulocytose est effondrée et l'anémie peut être très profonde si une érythroblastopénie virale est révélatrice de la maladie.
Les indices érythrocytaires mesurés et calculés par les automates d'hématologie permettent une orientation diagnostique :

- Le volume globulaire moyen (VGM) est souvent dans les fourchettes normales, parfois nettement diminué. La courbe de distribution des volumes est étalée, reflétant l'anisocytose. La partie de la courbe décalée vers la gauche correspond aux microsphérocytes tandis que la partie macrocytaire correspond à la présence de réticulocytes (figure 12). Ni le VGM, ni le pourcentage de cellules microcytaires n'ont de valeur diagnostique. Par contre le pourcentage de microcytes est corrélé à un score de gravité de la maladie[6].

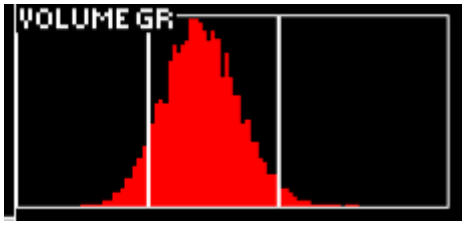


Figure 12. Courbe de distribution des volumes érythrocytaires (automate Advia 2120 ; Siemens)

- La CCMH calculée est élevée, supérieure à 35 g/dL chez plus de la moitié des patients atteints de sphérocytose héréditaire. La CCMH présente une bonne spécificité mais une pauvre sensibilité. La combinaison d'une CCMH > 35 g/dL et d'un indice de distribution érythrocytaire > 14 % permet de diagnostiquer une sphérocytose héréditaire probable avec une sensibilité de 63 % et une spécificité de 100 %[69].
- La diminution du volume réticulocytaire (VGMr), en dessous de 100 fL (valeur normale chez l'adulte : 111,17 ± 6,37 fL), est d'un grand apport diagnostique. A l'inverse, un VGMr élevé (> 115 fL) est un argument contre le diagnostic de sphérocytose héréditaire[6].
- Le plus précieux en ce qui concerne la sphérocytose est l'existence d'un pourcentage anormalement élevé de cellules hyperdenses, reflet de la déshydratation cellulaire (valeur normale < 4 %) [6]. Ce signe, donné par certains automates, constitue un bon critère de dépistage des malades. Il s'associe à la constatation sur l'histogramme des concentrations d'un débord vers la zone des cellules denses (figure 13). Cependant un pourcentage anormalement élevé de cellules hyperdenses n'est pas spécifique de la sphérocytose héréditaire et peut être retrouvé dans certaines hémoglobinopathies (Hb SC, Hb CC), dans la xérocytose et dans les anémies hémolytiques auto-immunes. Le pourcentage de cellules hyperdenses n'est pas corrélé à l'expression clinique de la maladie[6].

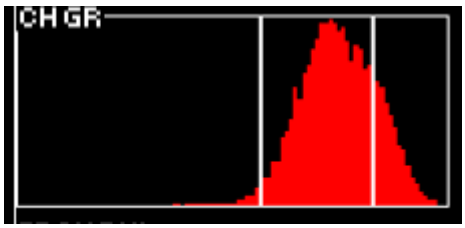


Figure 13. Histogrammes des distributions des concentrations en hémoglobine (g/dL) (automate Advia 2120 ; Siemens)

Ces signes doivent faire examiner le frottis sanguin.

5.1.2. Morphologie des globules rouges

L'examen du frottis est la première étape ; les avancées des connaissances et la complexité croissante des moyens diagnostiques ne doivent pas en faire oublier l'apport capital.

L'examen du frottis sanguin coloré au May Grünwald Giemsa (MGG) montre la présence de sphérocytes en pourcentage très variable d'un malade à l'autre. Les sphérocytes sont des globules rouges denses, arrondis de petite taille, ayant perdu leur halo clair central (figure 14).

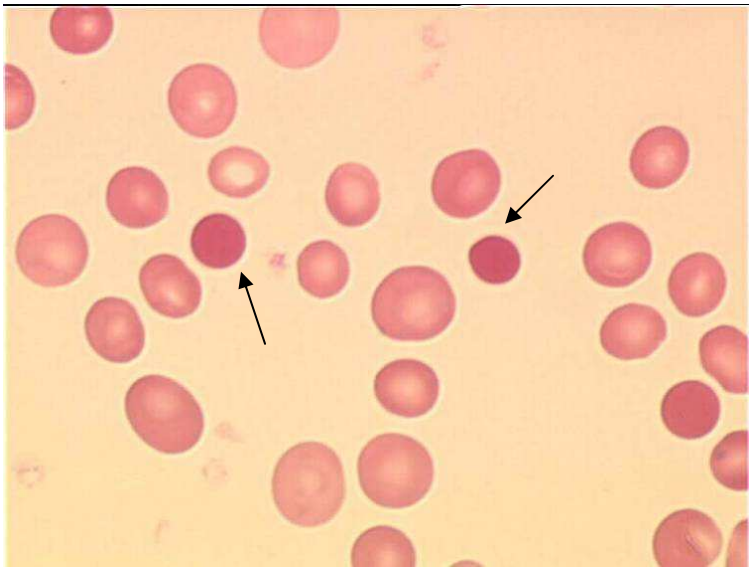


Figure 14. Sphérocytes sur frottis sanguin. MGG x 100 (photo de Sylvain SALIGNAC)

La découverte de sphérocytes est le premier argument en faveur du diagnostic, mais elle n'est pas synonyme de sphérocytose héréditaire. En effet, des sphérocytes peuvent être observés dans les anémies hémolytiques auto-immunes à anticorps chauds, parfois à anticorps froids et dans les anémies allo-immunes comme la maladie hémolytique du nouveau-né. Certains contextes particuliers montrent également des sphérocytes : microangiopathies thrombotiques, brûlures sévères, septicémie à Clostridium, quelques morsures de serpents et d'insectes (venins hémolytiques), diverses réactions transfusionnelles retardées, les administrations de plasma ABO incompatibles, les transplantations de cellules souches sans compatibilité ABO.

De plus, dans les formes bénignes, la recherche de sphérocytes peut être négative et c'est seulement après une étude scrupuleuse que de rares sphérocytes pourront être mis en évidence. Une très forte réticulocytose peut également masquer le caractère sphérocytaire.

Dans certains cas, en particulier dans les déficits en β-spectrine, ou après splénectomie, les sphérocytes sont associés à des acanthocytes ou à des sphéro-acanthocytes[27]. Lorsque l'anomalie est un déficit en protéine bande 3, certaines hématies peuvent présenter un

bourgeonnement, avec étranglement, à un pôle de la cellule évoquant un aspect en « champignon » spécifique de cette variété de sphérocytose héréditaire (figure 15).

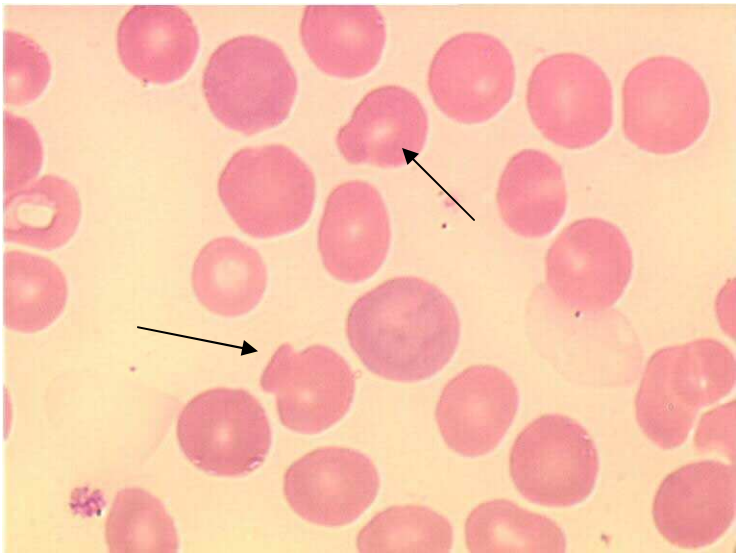


Figure 15. Sphérocytes en "champignon" associés à un déficit en bande 3 sur frottis sanguin. MGG x 100 (photo d'après le CD « Collection Tutorial de Pathologie Editeur : TRIBVN © 2003 Anémies - Anomalies érythrocytaires »)

Dans les formes avec spectrine β tronquée, des elliptocytes sphérocytaires peuvent être observés.

Des ovalostomatocytes sont retrouvés en association aux sphérocytes dans les déficits en protéine 4.2.

Dans les déficits en ankyrine, seuls les sphérocytes sont observés sur le frottis.

Les corps de Howell-Jolly sont absents au diagnostic, mais constants après splénectomie totale.

Des érythroblastes circulants sont rares, sauf dans les formes sévères.

Le diagnostic est très difficile en période néo-natale car des sphérocytes sont retrouvés de manière physiologique chez tous les nouveaux-nés.

5.1.3. Signes biologiques d'hémolyse

Les stigmates biologiques classiques d'hémolyse sont retrouvés ; c'est-à-dire une augmentation de la bilirubine non conjuguée associée à un effondrement de l'haptoglobine et une augmentation des lacticodeshydrogénases (LDH).

Avant d'orienter le diagnostic vers celui de sphérocytose héréditaire et d'entamer des explorations spécialisées, les autres causes d'anémie hémolytique doivent être éliminées, en particulier les anémies hémolytiques auto-immunes à auto-anticorps chauds (IgG) ou froids (IgM). Il faut donc effectuer au minimum un test de Coombs direct.

5.2. Examens spécifiques pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire (tableau 5)

Tests	**Principe / Faisabilité**	**Sensibilité / Spécificité**
Résistance osmotique	Test d'hémolyse / Examen de routine	66 % / faible
AGLT	Test d'hémolyse / Délai d'exécution du test > 3 h	81 % / > 95 %
Pink test	Test d'hémolyse / Examen simple, délai d'exécution du test < 3 h	96 % / 79 à 94 %
Ektacytométrie en gradient osmolaire	Etude de la déformabilité des globules rouges / 1 seul laboratoire en France, délai d'exécution du test : 24 h	Examen de référence
Cytométrie en flux	Marquage des globules rouges à l'EMA (liaison à la bande 3)	92,7 % / 99,1 %

Tableau 5. Examens biologiques spécifiques pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire[68].

5.2.1. Etude de la fragilité osmotique des hématies

Comme nous l'avons vu précédemment, le sphérocyte, du fait des lésions membranaires provoquant une diminution de la surface membranaire par rapport à son volume, est une cellule dont la fragilité osmotique est augmentée. Ainsi, il existe plusieurs examens basés sur l'étude de la fragilité osmotique. Ces tests sont peu coûteux et réalisables par tous les laboratoires. Ils doivent être réalisés sur des globules rouges les plus frais possibles, gardés à 4°C si l'examen doit être différé de quelques heures. Les globules rouges d'un témoin prélevé dans les mêmes conditions seront testés en parallèle.

a) Résistance globulaire osmotique

Ce test, découvert par Chauffard, repose sur la diminution du rapport surface/volume. Lorsque ce rapport est diminué, le volume critique d'hémolyse est atteint plus rapidement avec des solutions d'osmolarité plus élevée : la résistance aux solutions hypotoniques est diminuée.

Une fragilité osmotique normale ne permet cependant pas d'éliminer une sphérocytose héréditaire : 34 % des patients non splénectomisés n'ont pas de fragilité osmotique augmentée, en particulier ceux présentant des formes légères à modérées de la maladie. La découverte d'une fragilité osmotique normale chez un nombre significatif de patients atteints de sphérocytose héréditaire peut s'expliquer par une autre caractéristique commune mais encore sous-estimée de la maladie qui est la déshydratation cellulaire. En effet, la fragilité osmotique dépend non seulement de la surface cellulaire mais aussi de son volume. Ainsi une diminution du volume peut compenser la perte de surface membranaire aboutissant à un rapport surface/volume normal et donc une fragilité osmotique normale[6]. Le test peut également être normal si une carence en fer ou un ictère par obstruction sont associés ou après une crise aplasique quand le nombre de réticulocytes est augmenté.

Le test peut être sensibilisé en le répétant après 24 heures d'incubation à 37°C. Il reste cependant normal chez 14 % des patients non splénectomisés. Pendant l'incubation, les globules rouges continuent à métaboliser du glucose afin de produire l'énergie nécessaire au maintien de leur forme et taille. Ces conditions sont moins bien supportées par les sphérocytes que par les cellules normales, ce qui aggrave leur fragilité osmotique. Durant la période d'incubation, les hématies pathologiques diminuent plus rapidement que les cellules normales, et augmentent également leur volume en raison d'une hydratation cellulaire. La

combinaison de ces deux phénomènes augmente la susceptibilité des sphérocytes à la lyse osmotique par rapport aux cellules normales[6].

Longtemps, ce test a été le test de référence pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire, bien que sa sensibilité et sa spécificité soit faible. En effet la résistance globulaire osmotique donne des faux positifs dans les anémies hémolytiques d'origine immune ainsi que dans d'autres causes d'hémolyse et chez les patients atteints d'elliptocytose héréditaire.

Cette technique est laborieuse et lourde à mettre en œuvre.

b) Test d'auto hémolyse 48h à 37°C

Normalement l'hémolyse spontanée est inférieure à 5 % et à 1 % sans et avec glucose. Dans la sphérocytose héréditaire, elle est très augmentée (5 à 20 %), partiellement corrigée par l'addition de glucose (alors que dans les anémies hémolytiques auto-immunes, il n'y a pas de correction).

Cependant un test normal ou subnormal n'exclut pas le diagnostic de sphérocytose héréditaire.

Le test d'auto-hémolyse est très sensible mais peu spécifique. Des patients atteints de sphérocytose héréditaire avec une résistance globulaire osmotique normale présentent une auto-hémolyse perturbée et corrigée par l'addition de glucose[70]. Ce test est peu réalisé actuellement.

c) Test de lyse au glycérol acidifié (AGLT)

Ce test utilise un milieu hypotonique contenant du glycérol qui ralentit l'entrée d'eau dans le globule rouge. On mesure le temps nécessaire pour obtenir 50 % de l'hémolyse initiale ($AGLT_{50}$) c'est-à-dire la valeur de l'absorbance mesurée à 625 nm avant l'addition du glycérol.

Chez un sujet normal, $AGLT_{50}$ est obtenu après plus de 30 minutes. Tandis que dans la sphérocytose héréditaire, l'hémolyse est plus rapide : $AGLT_{50}$ est obtenu en 50 à 100 secondes.

La sensibilité de test de lyse au glycérol acidifié est de 81,6 % et la spécificité est de 100 % en comparaison avec le pink test[71].

Cette technique est simple, rapide et peu coûteuse. Elle peut être réalisé jusqu'à 24 heures après le prélèvement sanguin.

d) Pink test[72]

Il s'agit d'un test de lyse au glycérol acidifié modifié. Ce test, semi-quantitatif ou quantitatif, mesure l'hémolyse d'un petit échantillon de sang dans une solution contenant du glycérol (135 mmol/L), du NaCl (25 mmol/L), du NaN_3 (1,5 mmol/L) et du HCl avec une osmolarité fixée précisément à 290 mOsm. Cette solution est tamponnée à un pH de 6,6. Ce test doit impérativement être réalisé sur sang frais (< 3 heures après le prélèvement).

Après avoir incubé les globules rouges du témoin et les globules rouges du patient avec la solution, on procède à une centrifugation. La densité optique du surnageant est mesurée à 540 nm (première absorbance). Une deuxième mesure de l'absorbance est réalisée après avoir lysé tous les globules rouges. Le résultat correspond au rapport entre ces deux valeurs d'absorbance. Chez un sujet normal ce rapport est compris entre 0 et 28,5 %. Ce test est en faveur d'une hémolyse pathologique si le résultat est supérieur à 28,5 %.

La sensibilité varie de 96 à 97,4 %, mais sa spécificité est seulement de 78,9 % par comparaison avec l'ektacytométrie[73].

Ce test a l'avantage de consommer très peu de sang, d'être d'exécution rapide et peut être réalisé par tous les laboratoires qui ont accès à un osmomètre. Les résultats ne dépendent pas du pH de la solution (contrairement au test de lyse au glycérol acidifié) et donc la reproductibilité est bonne.

e) Test de cryohémolyse[7 ; 73]

Le test de cryohémolyse ne dépend pas du rapport surface/ volume mais des propriétés de la membrane érythrocytaire et parait plus sensible et plus spécifique que l'étude de la résistance osmotique. Ce test est positif chez les patients atteint de sphérocytose héréditaire et présentant une résistance osmotique normale.

Lorsque des globules rouges, placés dans un milieu hypertonique, subissent un choc thermique (de 37°C à 0°C), il se produit une hémolyse massive. L'importance de l'hémolyse dépend de la tonicité et de la température du milieu. Les sphérocytes, quel que soit le déficit moléculaire incriminé, sont plus sensibles à la cryohémolyse que les globules rouges normaux.

Le pourcentage de cryohémolyse est le rapport entre la densité optique mesurée à 540 nm de l'échantillon après 10 minutes d'incubation à 0°C et de la densité optique de l'échantillon avec une hémolyse de 100 %. Un sujet normal a un pourcentage de cryohémolyse compris entre 3 et 15 %. En cas de sphérocytose héréditaire, ce pourcentage est supérieur à 20 %.

Ce test a une sensibilité de 100 % et une spécificité de 90 %. L'étude de Romero et coll.[74] montre des pourcentages de cryohémolyse normaux chez les patients présentant une hémolyse induite mécaniquement (porteurs de prothèses cardiaques valvulaires mécaniques). De plus, ce test est peu coûteux, simple à mettre en œuvre et rapide. Il ne nécessite qu'un faible volume de sang (200 à 500 µL), ce qui le rend accessible même aux nouveaux-nés. D'autant plus que contrairement à la résistance osmotique qui est diminuée chez les nouveaux-nés, il n'y a aucune influence de l'âge sur la cryohémolyse.

Tous ces tests d'hémolyse peuvent être positifs dans d'autres anomalies membranaires : les anémies hémolytiques auto-immunes, les formes sévères d'elliptocytose héréditaire (pyropoïkilocytoses héréditaires), dans certaines dysérythropoïèses congénitales de type II (CDA II) et uniquement pour les tests dépendant du rapport surface/volume, dans les stomatocytoses héréditaires avec cellules hyperhydratées.

5.2.2. L'ektacytométrie en gradient osmolaire et l'élongation

L'ektacytomètre est un appareil qui mesure la déformabilité des globules rouges soumis à une force de cisaillement constante générée par un viscosimètre de Couette. Conjointement, on fait varier l'osmolarité du milieu de suspension des cellules. Les globules rouges circulent en flux continu, passent devant un rayon laser dont ils diffractent la lumière. Le signal lumineux est traduit en index de déformabilité (ID) qui quantifie l'étirement ou l'ellipticité de la cellule. Il est enregistré de façon continue en fonction du gradient osmolaire[75]. On obtient une courbe indiquant en ordonnée un index de déformabilité et en abscisse l'osmolarité du milieu de suspension.

La courbe obtenue comporte trois points importants (figure 16) :

- Le point « hypo » ou « O min » : osmolarité, en région hypoosmolaire, pour laquelle la déformabilité est nulle, car les hématies sont devenues parfaitement sphériques, il traduit le rapport surface/volume ;
- L'ID max : index de déformabilité maximale ; il est directement dépendant de la surface cellulaire ;
- Le point « hyper » ou O' : osmolarité, en région hyperosmolaire, pour la quelle la déformabilité des hématies est égale à la moitié de l'ID max ; il est corrélé avec la CCMH, et donc avec l'état d'hydratation cellulaire.

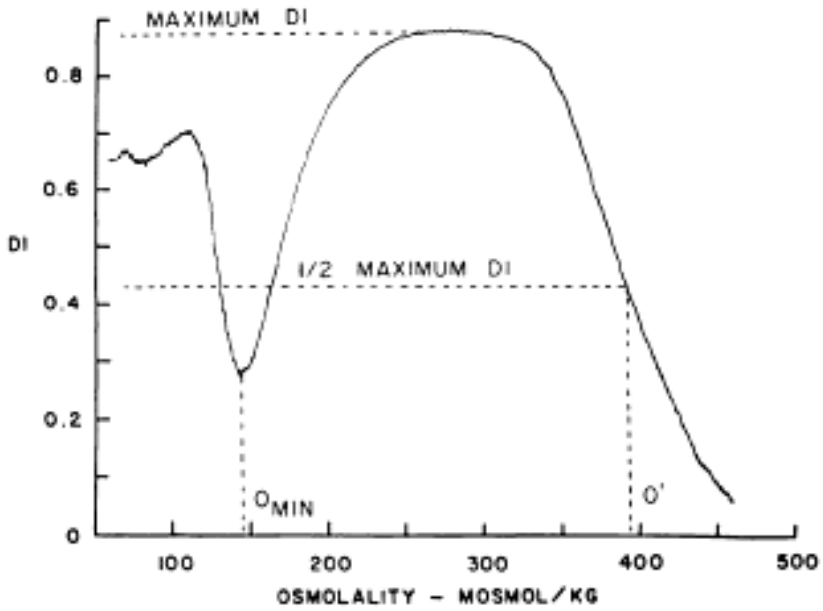


Figure 16. Ektacytométrie en gradient osmolaire : courbe de déformabilité des globules rouges d'un patient normal.

L'étude de la déformabilité des globules rouges de patients atteint de sphérocytose héréditaire en gradient osmolaire montre (figure 17)[6] :

- Une diminution de l'index de déformabilité ;
- Un point « hypo » ou « O min » le plus souvent dévié à droite. Ce point qui correspond à l'osmolarité pour laquelle 50 % des hématies sont hémolysées dans le test de fragilité osmotique, témoigne de la diminution du rapport surface/volume. Un point hypo-osmolaire normal ne permet pas d'éliminer une sphérocytose héréditaire ;
- Un point « hyper » ou « O' » dévié vers la gauche, signe de déshydratation cellulaire.

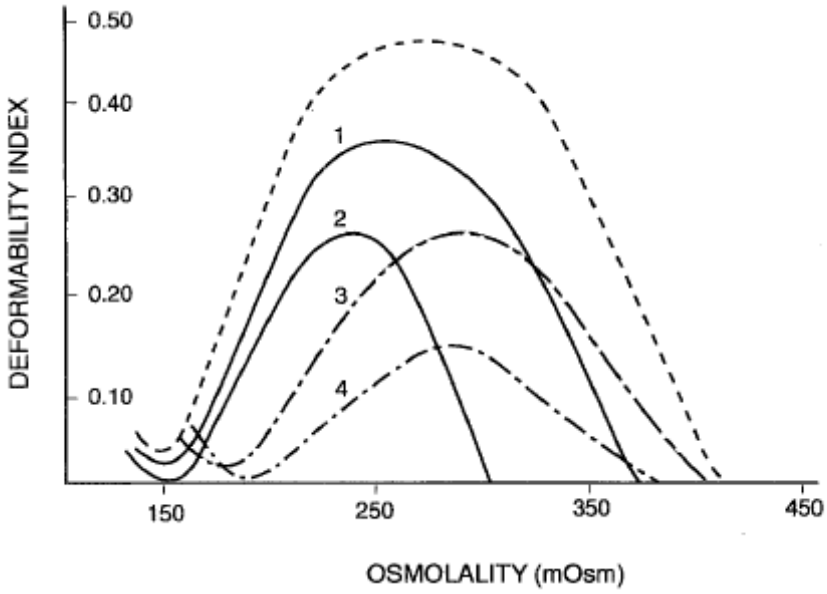


Figure 17. Ektacytométrie en gradient osmolaire : courbes de déformabilité des globules rouges de 4 patients atteints de sphérocytose héréditaire. ID max est plus bas que la normale pour les 4 patients. O min est normal chez les patients 1 et 2 et augmenté chez les patients 3 et 4. O' est diminué chez trois patients (1, 2 et 4), traduisant une déshydratation cellulaire dans ces 3 échantillons.

Il s'agit d'une technique plus sophistiquée, très performante mais peu répandue. Le patient 2 présente une déshydratation très importante (O' décalé vers la gauche) ce qui compense la perte de surface et se traduit par un O min normal[6].

Cette technique permet ainsi de faire le diagnostic de tous les cas de sphérocytose héréditaire et de les distinguer des autres anomalies constitutionnelles de membrane (ellyptocytoses héréditaires, pyropoïkylocytoses héréditaires et les deux formes de stomatocytoses héréditaires). Seuls certains cas de CDA II et d'anémies hémolytiques auto-immunes peuvent reproduire une courbe de sphérocytose héréditaire[68].

L'ektacytométrie est une technique très sophistiquée, fiable et très sensible. Cependant elle est peu répandue en raison d'un petit nombre d'appareil disponible (un seul ektacytomètre en France). Elle n'est donc pas utilisée en pratique courante.

Ainsi chez les patients pour lesquels le diagnostic de sphérocytose héréditaire peut être établi à partir de l'histoire clinique et familiale, de l'examen clinique, des indices érythrocytaires, de la présence de sphérocytes sur le frottis sanguin et de l'étude de la résistance globulaire osmotique avant et après incubation, il n'est pas nécessaire d'effectuer systématiquement une exploration par ektacytométrie. Cynober et coll.[6] proposent la stratégie suivante si la résistance globulaire osmotique est normale en cas de suspicion de sphérocytose héréditaire :

- Pour exclure le diagnostic de sphérocytose héréditaire face à une résistance globulaire osmotique normale, il est essentiel de documenter une CCMH normale.
- Si la CCMH et/ou le pourcentage de cellules hyperdenses sont augmentés, le diagnostic de sphérocytose héréditaire doit être sérieusement considéré en dépit d'une résistance globulaire normale et l'ektacytométrie doit être réalisée.

A Nancy, un test d'élongation Lorca® (Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer) de principe proche de l'ektacytométrie sauf qu'il n'y a pas de gradient osmolaire, est réalisé et révèle une diminution importante de la déformabilité des érythrocytes, en réponse à une augmentation des forces de cisaillement dans la sphérocytose héréditaire (figure 18).

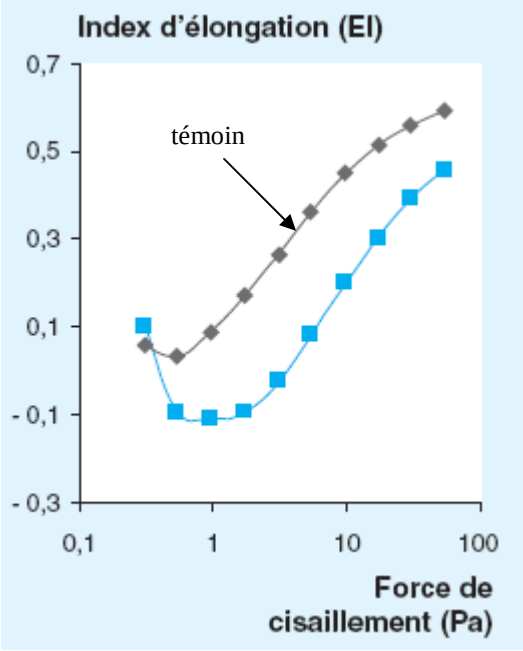


Figure 18. Test d'élongation Lorca®

5.2.3. Méthode de cytométrie en flux après marquage des globules rouges avec l'éosine-5'-maleimide (EMA)

Ce nouveau test, basé sur la mesure de l'intensité de la fluorescence des globules rouges après incubation avec l'éosine-5'-maleimide (EMA), a été proposé pour le diagnostic de la sphérocytose héréditaire en 2000 par l'équipe de King et coll.[9].

La liaison de l'EMA à la lysine-430 sur la première boucle extracellulaire de la protéine bande 3 est responsable d'environ 80 % de la fluorescence (figure 19)[76 77]. Le reste de la fluorescence est imputable à la liaison de l'EMA avec des groupements sulfhydryles à la surface des globules rouges. La liaison de l'EMA à trois molécules contenant des groupements sulfhydryles appartenant au « complexe Rh » a été récemment montrée : CD47, RhAG et le polypeptide Rh. Une diminution de ces molécules à la surface des globules rouges a été démontrée dans la sphérocytose héréditaire. D'autres protéines contenant des groupements thiol pourraient être encore impliquées. La liaison de l'EMA à ces protéines (bande 3, CD47, RhAG et polypeptide Rh) qui sont étroitement associées au cytosquelette du globule rouge, explique la spécificité élevée de ce test. Bien que l'EMA n'interagisse pas directement avec la spectrine, l'ankyrine et la protéine 4.2, la liaison de l'EMA au CD47, au polypeptide Rh et à la RhAG est un reflet indirect et fiable de la composition du cytosquelette[78].

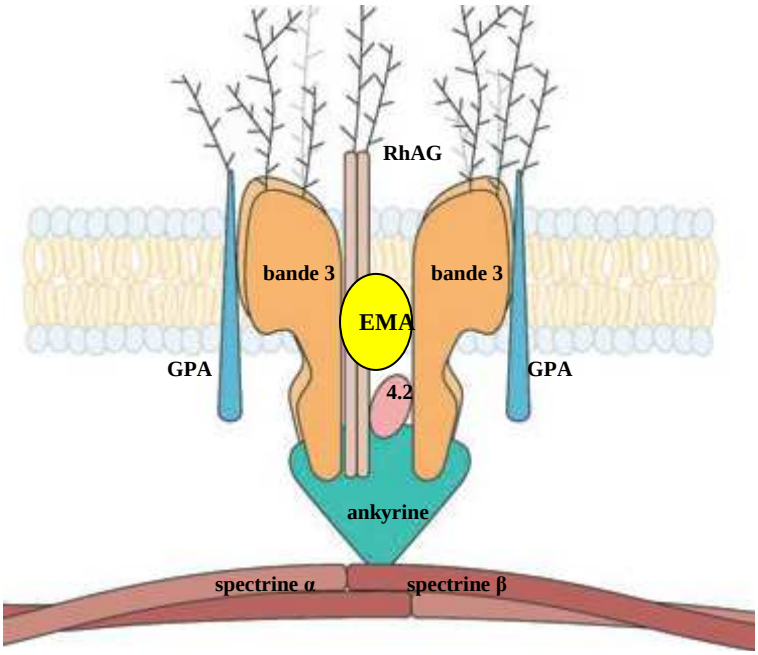


Figure 19. Liaison de l'EMA avec la protéine bande 3

Ce test présente de nombreux avantages : rapidité (< 2 heures), spécificité (99,1 %) et sensibilité (92,7 %) [9]. De plus, il utilise de très faibles quantités de sang et a l'avantage sur les tests précités de pouvoir être différé de plusieurs jours. Plusieurs études confirment les résultats précédents et proposent cette méthode comme un test de dépistage de la sphérocytose héréditaire[79] [80] [81]. Cependant, deux patients avec un déficit en ankyrine isolé avaient une fluorescence normale dans l'étude de King et coll.[9]. Or le déficit en ankyrine est l'anomalie membranaire la plus fréquemment retrouvée en France. Des faux-positifs ont été retrouvés dans d'autres anomalies membranaires (pyropoïkylocytose héréditaire, CDA II et ovalocytose du sud-est asiatique). Ce test semble donc intéressant mais nécessite d'être mieux évalué en France.

Les cytomètres en flux étant différents d'un laboratoire à l'autre, il est important que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs de référence.

5.2.4. L'électrophorèse des protéines de la membrane des globules rouges en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)[82]

Il s'agit d'une technique ayant pour but de séparer sur un même gel les protéines majeures de la membrane érythrocytaire afin de calculer leur pourcentage respectif. Cette analyse permet de quantifier chacune des protéines par une étude densitométrique du gel et permet également de mettre en évidence l'absence ou la diminution de la bande de migration de la protéine déficitaire ou encore une bande de migration anormale (figure 20).

Cette technique reposant sur les travaux de Fairbanks comprend plusieurs étapes :

1. une extraction des protéines totales de la membrane érythrocytaire par une lyse ménagée (osmotique et chimique) des globules rouges suivie d'une ultracentrifugation et d'un lavage permettant ainsi d'obtenir uniquement les membranes érythrocytaires
2. un dosage des protéines membranaires par méthode colorimétrique
3. une dissociation des protéines de membrane obtenue par adjonction de sodium dodécyl sulfate (SDS). Il s'agit d'un détergent ionique qui déroule les protéines en chaînes polypeptidiques allongées. Son action est combinée à celle d'un réducteur de ponts disulfures qui sépare les sous-unités des protéines complexes

4. une électrophorèse réalisée sur gel de polyacrylamide (PAGE). L'acrylamide après polymérisation forme un gel en réseau permettant un tamisage des protéines. Les gels utilisés peuvent être fabriqués par les laboratoires eux-mêmes. Il existe également des gels prêts à l'emploi commercialisés. On distingue deux types de gels :

- des gels avec gradient linéaire d'acrylamide : les mailles du réseau sont d'autant plus serrées que la concentration en acrylamide est plus élevée. Les protéines toutes chargées négativement par fixation de molécules de détergent migrent de la cathode vers l'anode. Elles vont être piégées par les mailles du réseau en fonction de leur poids moléculaire. Ainsi un réseau peu serré en début de gel permet aux protéines de haut poids moléculaire de se séparer, et un réseau plus serré en fin de gel retient les protéines de bas poids moléculaire (méthode de Laemmli)
- Des gels avec gradient exponentiel d'acrylamide permettant de mieux séparer les protéines érythrocytaires de poids moléculaires voisins (spectrine α et β, et ankyrine) (méthode de Fairbanks)

5. une révélation des protéines par un colorant tel que le bleu de Coomassie

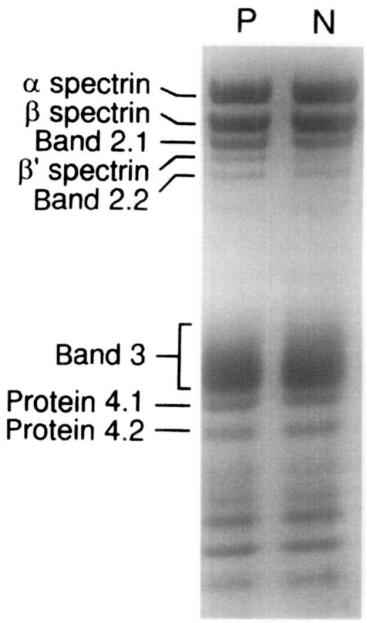


Figure 20. Analyse des protéines de la membrane des globules rouges : noter la bande supplémentaire chez le patient (P) comparé à l'individu normal (N) qui correspond à une spectrine β tronquée[12]

Bien que cette technique ne soit ni très précise, ni très sensible, elle permet d'identifier la protéine membranaire déficitaire dans environ 60 % des cas de sphérocytose héréditaire. Les anomalies les plus fréquentes sont liées à une mutation du gène ANK1 qui entraîne un déficit en ankyrine, associé à un déficit secondaire en protéine 4.2 et/ou en spectrine, protéines toutes deux liées à l'ankyrine. Ce déficit en ankyrine, s'il est modeste, peut-être masqué par l'augmentation des réticulocytes, riche en cette protéine. L'électrophorèse doit donc être interprétée en fonction du taux de réticulocytes. Les mutations du gène EPB3 entraînent un déficit en bande 3 avec une diminution secondaire de la protéine 4.2, liée à la bande 3. Il existe plus rarement des déficits primaires en protéine 4.2 ou en spectrine α ou β. Il est admis que le phénotype des déficits en spectrine est plus sévère que celui des déficits en protéine bande 3 et que le taux résiduel de spectrine est inversement corrélé avec la sévérité de l'anémie[83]. L'électrophorèse peut ne pas détecter la protéine déficitaire dans les formes légères de la maladie. Il semble que cette technique soit plus sensible lorsqu'elle est réalisée chez des patients splénectomisés.

Il s'agit d'une technique délicate réservée à des laboratoires spécialisés.

Dans les sphérocytose héréditaires, lorsque le mode de transmission est dominant et que le diagnostic a été confirmé par les tests conventionnels, l'électrophorèse des protéines membranaires n'est pas indiquée. En revanche, il est licite de faire systématiquement cet examen dans les formes non dominantes afin de ne pas méconnaître un éventuel CDA II. L'électrophorèse des protéines membranaires est également indiquée dans les formes atypiques de sphérocytose héréditaire avec anémie macrocytaire et test de Coombs négatif à plusieurs reprises. Enfin, ce type d'examen a toute sa place pour l'exploration familiale des rares formes très sévères, homozygotes ou hétérozygotes composites, ainsi que pour les familles qui associent une sphérocytose héréditaire et une autre pathologie érythrocytaire pouvant masquer certains signes biologiques de sphérocytose comme, par exemple, les familles cumulant une sphérocytose héréditaire et une β- thalassémie hétérozygote[60].

Une nouvelle méthode de séparation des protéines de la membrane érythrocytaire par électrophorèse capillaire sur gel (SDS-CGE) a été décrite[84]. Un capillaire est rempli avec un polymère. Celui-ci peut être un gel réticulé ou une solution d'un polymère linéaire non réticulé. Les protéines dénaturées en présence de SDS sont séparées suivant leur masse. Sept protéines de la membrane érythrocytaire (spectrine α et β, ankyrine 2.1, protéine bande 3, 4.1 a et b, et 4.2) ont été séparées et identifiées par SDS-CGE. Cette méthode est très reproductible et pourrait remplacer le SDS-PAGE dans le diagnostic de la sphérocytose héréditaire.

5.2.5. Etude moléculaire

L'étude du déficit moléculaire est possible par technique SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) ou par PCR amplifiant l'ADNc ou l'ADN génomique.

Aucune équipe ne réalise en routine le séquençage de l'un des cinq gènes impliqués dans la sphérocytose héréditaire. L'indication d'une étude moléculaire est exceptionnelle et réservée au conseil génétique dans des cas de sphérocytose héréditaire très sévère.

5.3. Recommandations 2004 du British Journal of Haematology pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire[22]

1. En présence d'antécédents familiaux de sphérocytose héréditaire et de signes cliniques évidents, l'étude de l'hémogramme et des indices érythrocytaires avec compte des cellules hyperdenses est, en général, suffisante pour porter le diagnostic de sphérocytose héréditaire chez un patient ayant une anémie hémolytique en dehors de la période néonatale (niveau 3, grade B).
2. Un test spécifique est nécessaire si le diagnostic est équivoque (par exemple, présence de quelques sphérocytes sur le frottis sanguin sans aucun antécédent familial, et sans aucun signe clinique et biologique). Les tests recommandés sont le test de cryohémolyse ou la méthode de cytométrie en flux après marquage des globules rouges avec l'EMA (niveau 2a / 3, grade B).
3. Un diagnostic de confirmation peut être nécessaire dans certains cas et la méthode de choix est l'électrophorèse des protéines membranaires (niveau 3, grade B).
4. L'étude moléculaire n'est pas requise pour le diagnostic de la sphérocytose héréditaire (niveau 3, grade B).

NB : Grade des recommandations

Le grade d'une recommandation est établi à partir du niveau de preuve scientifique et de l'accord professionnel sur le sujet. La validité scientifique d'une étude est fonction de la qualité de la méthodologie et de sa réalisation, de l'analyse de ses résultats et de la pertinence de ses conclusions.

Grade A des recommandations = preuve scientifique établie = prouvé
Niveau 1 de preuve scientifique fournie par la littérature : essais comparatifs randomisés de forte puissance, méta-analyse d'essais comparatifs randomisés, analyse de décision basée sur des études bien menées.

Grade B des recommandations = présomption scientifique = présumé
Niveau 2 de preuve scientifique fournie par la littérature : essais comparatifs randomisés de faible puissance, études comparatives non randomisées bien menées, études de cohorte.

Grade C des recommandations = faible niveau de preuve scientifique = admis
Niveau 3 de preuve scientifique fournie par la littérature : études cas témoins.
Niveau 4 de preuve scientifique fournie par la littérature : études comparatives comportant des biais importants, études rétrospectives, séries de cas, études épidémiologiques descriptives (transversale, longitudinale).

6. Diagnostic différentiel

La présence de sphérocytes, une fragilité osmotique augmentée ou l'existence de cellules hyperdenses ne sont pas pathognomoniques de la sphérocytose héréditaire. Elles existent également au cours des pathologies suivantes :

6.1. L'anémie hémolytique acquise d'origine immune[44]

Elle peut être auto-immune ou liée à une incompatibilité maternofoetale. La formation des sphérocytes est liée à une perte de membrane par phagocytose partielle, par les macrophages, du complexe antigène-anticorps ancré sur la membrane du globule rouge. Les résultats donnés par les automates, l'examen du frottis, l'étude de la résistance globulaire et l'ektacytométrie sont indiscernables de ceux de la sphérocytose héréditaire. Mais le contexte est différent (notion d'un test de Coombs direct érythrocytaire positif ou, chez le nouveau-né, d'une incompatibilité, le plus souvent ABO) et ces anomalies régressent avec le traitement ou le temps. Il faudra cependant chez le nouveau-né se méfier de l'association d'une incompatibilité ABO et d'une sphérocytose héréditaire.

6.2. Les elliptocytoses héréditaires (HE) sévères

Elles sont aussi liées à une anomalie des protéines de la membrane érythrocytaire, notamment spectrine et protéine 4.1. Il peut exister des cellules hyperdenses et des microsphérocytes provoqués par fragmentation. Dans ce cas, l'histogramme des volumes montre une sous-population microcytaire avec une courbe en double bosse ; la fragilité osmotique est augmentée. Le frottis révèle, outre la présence d'ellyptocytes, une fragmentation érythrocytaire (figure 21). La courbe d'ektacytométrie est anormale avec une diminution de la déformabilité et un aspect trapézoïdal, caractéristique de l'ellyptocytose[44].

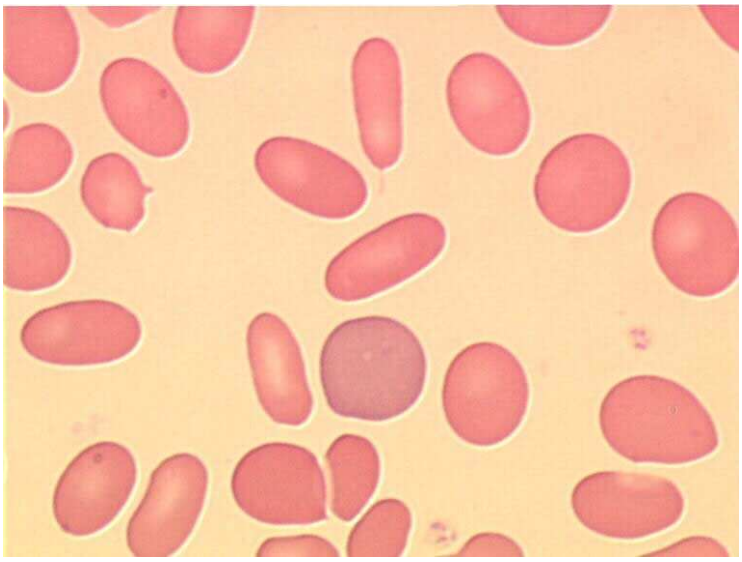


Figure 21. Elliptocytes sur frottis sanguin. MGG x 100 (photo d'après le CD « Collection Tutorial de Pathologie Editeur : TRIBVN © 2003 Anémies - Anomalies érythrocytaires »)

La pyropoïkylocytose héréditaire (HPP) est considérée comme une forme sévère d'HE. A la différence des globules rouges de l'HE pour lesquels l'intensité moyenne de fluorescence est normale après marquage à l'EMA, une réduction marquée de fluorescence est observée dans l'HPP (figure 22). Cette réduction de fluorescence dans l'HPP est plus basse que celles observées dans les sphérocytoses héréditaires. Quand l'intensité moyenne de fluorescence est au-dessous de l'intervalle inférieur de référence pour la sphérocytose héréditaire, c'est probablement une HPP si le VGM est inférieur ou égal à 60 fL. Une analyse de la spectrine est alors recommandée pour confirmer le diagnostic[85].

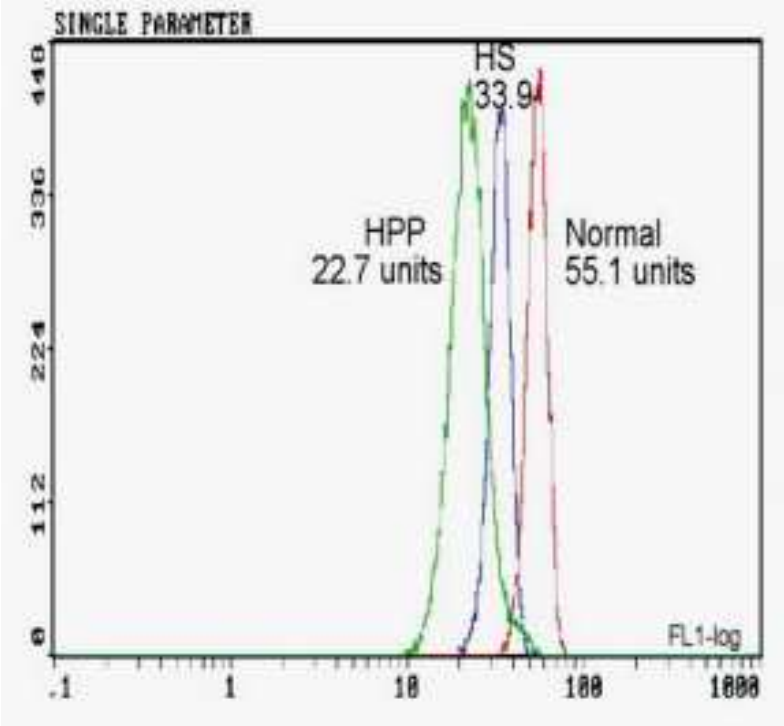


Figure 22. Overlay des histogrammes de fluorescence des globules rouges marqués à l'EMA d'un patient normal, d'un patient atteint de sphérocytose héréditaire (HS) et d'un patient atteint d'HPP[85]

6.3. La stomatocytose[44]

La stomatocytose héréditaire est secondaire à des anomalies de la perméabilité passive aux cations monovalents (Na^+, K^+). Ces anomalies peuvent entraîner soit une hyperhydratation des cellules (hydrocytose), soit une déshydratation (xérocytose). La présentation clinique peut être proche de celle d'une sphérocytose héréditaire.

La stomatocytose ne devrait guère prêter à confusion car l'aspect sur le frottis des stomatocytes est caractéristique (figure 23). Dans la forme avec cellules hyperhydratées, il existe une macrocytose et la fragilité osmotique est augmentée. Elle est diminuée dans la xérocytose où existent des cellules hyperdenses. Dans les deux cas, les aspects de la courbe de l'ektacytométrie sont très évocateurs. Ce diagnostic différentiel est important : la splénectomie dans ces deux affections est peu efficace et source de complications thrombotiques graves.

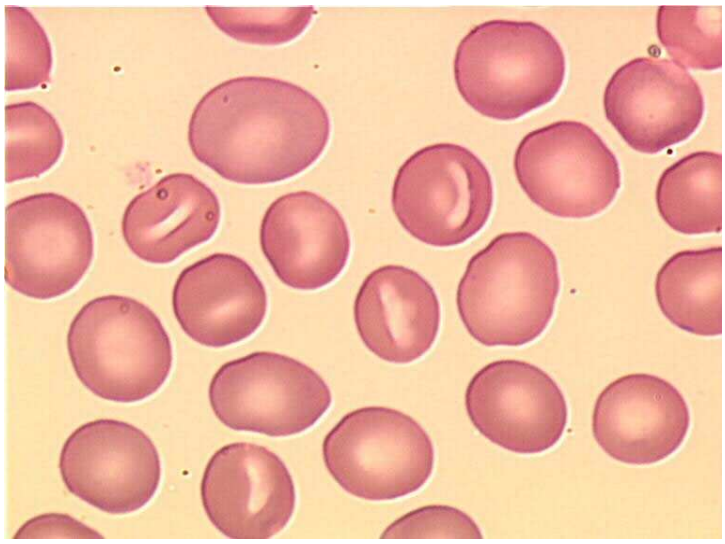


Figure 23. Stomatocytes sur frottis sanguin. MGG x 100 (photo d'après le CD « Collection Tutorial de Pathologie Editeur : TRIBVN © 2003 Anémies - Anomalies érythrocytaires »)

La cryohydrocytose héréditaire (CH) est une anémie hémolytique rare considérée comme une variété de la stomatocytose héréditaire. L'élément caractéristique est une fuite des ions sodium et potassium par la membrane érythrocytaire température-dépendante. Cette fuite ne s'observe pas à 8°C – 10°C, mais est présente à 23°C, et une fuite importante apparaît à froid. Ainsi, si le sang total hépariné ou prélevé sur EDTA est conservé sur glace durant la nuit, environ 50% des érythrocytes seront lysés.

6.4. L’ovalocytose du sud-est asiatique (SAO)

Il s'agit d'un trait asymptomatique à l'état hétérozygote, très répandu dans une région s'étendant de la Thaïlande à la Mélanésie. Il se caractérise par la présence de stomato-ovalocytes sur le frottis sans autre anomalie hématologique (figure 24), avec une perte totale de déformabilité élastique à l'ektacytométrie.

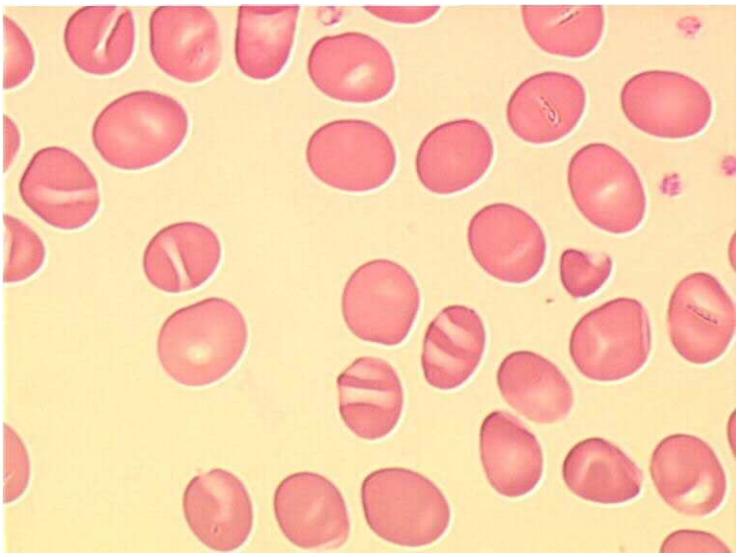


Figure 24. Stomato-ovalocytes sur frottis sanguin. MGG x 100 (photo d’après le CD « Collection Tutorial de Pathologie Editeur : TRIBVN © 2003 Anémies - Anomalies érythrocytaires »)

6.5. La dysérythropoïèse congénitale de type II (CDA II)[86] [87]

Le CDA II, de transmission autosomique récessive est l'anémie dysérythropoïétique congénitale la plus fréquente. Le CDA II est certainement sous-estimé car fréquemment confondu avec la sphérocytose héréditaire à cause de l'anémie hémolytique chronique avec splénomégalie, la fragilité osmotique augmentée et la présence de microsphérocytes. Or ce diagnostic différentiel est important afin de prévenir les surcharges en fer sévères qui sont fréquentes dans le CDA II et rares dans la sphérocytose héréditaire.

L'identification d'un CDA repose sur l'examen du frottis sanguin qui révèle la présence d'érythroblastes bi ou multinucléés et sur l'examen de la moelle au microscope optique qui met en évidence une hyperplasie médullaire et la présence d'érythroblastes binucléés. L'électrophorèse des protéines de la membrane érythrocytaire montre un aspect pincé de la bande 3 (transporteur des anions), et la présence de protéines du réticulum endoplasmique (la calréticuline, la protéine 78 de régulation du glucose et la disulfide isomérase, de 74, 59 et 58 kDa, respectivement).

7. Prise en charge

7.1. Suivi médical et biologique

7.1.1. Durant la période néonatale[68]

La surveillance clinique et hématologique doit être particulièrement attentive, du fait de la diminution rapide du taux d'hémoglobine, le plus souvent normal à la naissance. La surveillance, au moins hebdomadaire, de l'hémogramme doit être recommandée chez le nouveau-né jusqu'à obtention d'un taux d'hémoglobine stable bien toléré cliniquement.

7.1.2. Chez l'enfant en dehors de la période néonatale[68]

Une consultation d'hématologie pédiatrique est nécessaire une à trois fois par an en fonction de la sévérité de la maladie chez les enfants porteurs d'une anémie avec un taux d'hémoglobine inférieur à 10 g/dL ; elle comporte une appréciation de l'état général, de la tolérance à l'exercice physique, de la taille de la rate, la recherche d'une douleur provoquée de l'hypochondre droit et d'un ictère conjonctival. Le rythme de réalisation des hémogrammes est fonction de la symptomatologie clinique.

Dans les autres cas, un suivi par un pédiatre hématologue et une surveillance de l'hémogramme tous les ans à tous les deux ans, ou en cas de symptomatologie évocatrice d'une accentuation de l'anémie, est préconisé. Après splénectomie, un suivi clinique annuel est recommandé.

Des explications doivent être données aux familles sur la maladie et ses complications potentielles :

- aggravation de l'anémie ou survenue d'une anémie aiguë, notamment lors d'épisodes infectieux dont l'érythroblastopénie secondaire au parvovirus B19 pouvant nécessiter une transfusion ;
- survenue de lithiase vésiculaire ou encore de cholangite. Des signes évocateurs de lithiase vésiculaire doivent être recherchés à chaque consultation. L'échographie biliaire doit être effectuée en cas de symptomatologie clinique évocatrice ; elle est

systématique à partir de l'âge de quatre ans et répétée avec un intervalle de un à trois ans, et avant splénectomie.

7.1.3. Chez l'adulte[22]

Une visite annuelle pour les formes modérées de la maladie n'est pas recommandée. Ceci dit un suivi régulier permet de surveiller l'apparition de signes évocateurs de lithiase vésiculaire et d'assurer un suivi post-splénectomie (revaccination, antibioprophylaxie). Cela peut valoir la peine également de surveiller le statut martial une fois par an chez les patients non splénectomisés, afin de prévenir les surcharges en fer.

7.2. Thérapeutique

7.2.1. Supplémentation en folates[22]

Il est recommandé une supplémentation en folates dans les formes sévères et modérées de la sphérocytose héréditaire, à la dose de 2,5 mg par jour avant l'âge de cinq ans et 5 mg par jour après.

La supplémentation en folates est préconisée chez la femme enceinte quelque soit le degré de sévérité de la maladie.

7.2.2. L'érythropoïétine

L'érythropoïétine recombinante administrée précocement chez le nouveau-né anémique atteint de sphérocytose héréditaire pourrait permettre de diminuer les besoins transfusionnels. Dans une étude ouverte multicentrique menée chez 16 enfants atteints de sphérocytose héréditaire avec anémie sévère et âgés de 16 à 119 jours, un traitement par l'époetine bêta (Néorecormon®) (1000 UI/kg par semaine en trois injections par vois sous-cutanée) a permis une ascension rapide du taux de réticulocytes dès la fin de la première semaine chez 13 enfants sur 16, rendant ainsi ces enfants indépendants vis-à-vis des transfusions. Pendant la durée du traitement, la concentration d'hémoglobine est restée stable et 10 de ces 13 enfants n'ont pas nécessité de transfusion sanguine. Les doses d'érythropoïétine ont été progressivement décroissantes, puis le traitement a pu être interrompu avant l'âge de 9 mois en raison de la stabilité de la concentration de l'hémoglobine malgré la décroissance des doses d'érythropoïétine. Chez un nouveau-né atteint de sphérocytose, les auteurs recommandent de débuter un traitement par érythropoïétine uniquement si l'hémoglobine est inférieure à 8 g/dL

et les réticulocytes inférieurs à 200 g/L[88]. Une étude randomisée est nécessaire pour confirmer cette indication.

Cependant l'utilisation de l'érythropoïétine par voie sous-cutanée comporte un risque théorique d'érythroblastopénie auto-immune liée à l'apparition d'anticorps anti-EPO agissant à la fois sur l'érythropoïétine exogène et sur l'érythropoïétine endogène. En raison de ce risque même infime, il est difficile à ce jour, de recommander ce traitement en première intention chez le nouveau-né atteint de sphérocytose héréditaire tant que l'on ne disposera pas d'informations complémentaires.

7.2.3. Splénectomie

La rate constituant le site de destruction privilégié des sphérocytes, la splénectomie permet une diminution de l'hémolyse quelque soit le déficit protéique impliqué avec une augmentation franche de la durée de vie des globules rouges mais seulement dans les déficits en spectrine et en ankyrine[89]. La sphérocytose héréditaire n'est pas une indication en soi à la splénectomie. Avant toute splénectomie, il est essentiel d'avoir éliminé le diagnostic de stomatocytose héréditaire, maladie rare se compliquant presque constamment de complications thromboemboliques après splénectomie.

L'indication de la splénectomie dépend de l'importance de l'anémie et de sa tolérance clinique. Si on reprend la classification d'Eber et al[59,] la splénectomie est indiquée dans les formes sévères ; elle est souvent indiquée dans les formes modérées selon le degré d'anémie et son retentissement sur l'état général ; elle n'est pas indiquée dans les formes minimes et asymptomatiques. L'indication de la splénectomie chez un patient ayant une lithiase biliaire, sans anémie profonde ou mal tolérée est controversée. Cette indication est retenue dans les recommandations anglaises[22]. L'analyse respective des risques de survenue d'un sepsis après splénectomie ne plaide pas en faveur de la réalisation d'une splénectomie pour prévenir la récidive de lithiases biliaires. L'existence de récidives de lithiase biliaire après splénectomie, même rares, et les risques infectieux secondaires à celle-ci incitent les recommandations françaises à ne pas proposer de splénectomie chez un patient porteur de lithiase biliaire, en l'absence d'indication hématologique[68].

Différents types de splénectomie peuvent être proposés :

- La splénectomie totale semble être la technique de choix. Les complications telles que l'anémie et la lithiase vésiculaire diminuent dans les formes sévères de sphérocytose

héréditaire et sont abolies dans les formes modérées. Cependant la splénectomie totale expose les patients splénectomisés à un risque infectieux important.

- La splénectomie partielle peut être proposée comme alternative à la splénectomie totale dans certaines indications (enfants très jeunes avec une forme très sévère de la maladie), et permettrait de diminuer le risque infectieux postsplénectomie. La splénectomie subtotale permet de diminuer l'hémolyse (à un degré moindre cependant qu'une splénectomie totale) et probablement de préserver la fonction splénique de phagocytose. La croissance du moignon splénique est constante, mais n'entraîne pas toujours une aggravation de l'hémolyse[90].

La prophylaxie anti-infectieuse au décours d'une splénectomie est l'un des points majeurs de la prise en charge des patients atteints de sphérocytose héréditaire. La splénectomie entraîne un risque d'infections, principalement à pneumocoques. Ce risque est particulièrement élevé chez les enfants de moins de 5 ans et lors de la première année suivant la splénectomie mais il persiste toute la vie. La splénectomie doit donc être repoussée le plus tard possible, de préférence après l'âge de 6 ans, mais avant la puberté. La prophylaxie anti-infectieuse repose sur l'éducation des patients et de leur famille, les vaccinations avant la splénectomie et l'antibiothérapie prophylactique.

Enfin, la splénectomie pourrait favoriser la survenue de complications thromboemboliques ou d'hypertension artérielle pulmonaire à l'âge adulte.

7.2.4. Cholécystectomie[68]

Les indications sont :

- l'existence de complications secondaires à la présence de calculs
- l'existence d'une lithiase, même asymptomatique, au moment de la réalisation d'une splénectomie.

La réalisation d'une cholécystectomie systématique à l'occasion d'une splénectomie est controversée en l'absence de lithiase biliaire. L'indication d'une cholécystectomie en cas de lithiase asymptomatique de découverte fortuite est également sujette à discussion.

7.2.5. Transfusions[68]

La carte de groupe sanguin phénotypé doit être remise au patient ou à ses parents. Une transfusion de culot érythrocytaire phénotypé et compatible dans les systèmes Rhésus et Kell doit être effectuée en cas d'anémie mal tolérée cliniquement et d'anémie aiguë avec érythroblastopénie. Dans les autres cas, il n'existe aucune étude définissant un seuil transfusionnel optimal ; le seuil du taux d'hémoglobine recommandé pour indiquer une transfusion est généralement de 7 à 8 g/dL.

Partie II : Evaluation du diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux

1. Introduction

Récemment, une nouvelle méthode utilisant la cytométrie en flux a été proposée pour le diagnostic de la sphérocytose héréditaire. Cette technique est basée sur la mesure de l'intensité de fluorescence des globules rouges après incubation avec de l'éosine-5'-maleimide (EMA) qui se lie principalement avec la protéine bande 3. L'intensité de fluorescence des globules rouges des patients atteints de sphérocytose héréditaire est diminuée par rapport à l'intensité de fluorescence d'un patient normal.

L'objectif de ce travail est d'évaluer cette nouvelle méthode, de déterminer le seuil de la méthode et de proposer un arbre décisionnel pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire.

2. Matériels et méthodes

2.1. Groupes de patients

Tous les patients avec un diagnostic de sphérocytose héréditaire basé sur les critères suivants : anémie hémolytique, résistance globulaire anormale, la présence de sphérocytes sur le frottis sanguin et/ou une électrophorèse des protéines anormale ont été inclus dans l'étude sur une période allant du 15 octobre 2007 au 15 septembre 2008. Tous les patients avec des antécédents connus de sphérocytose héréditaire venus en consultation dans le service de médecine infantile 2 pendant cette période ont également été inclus.

De plus, les patients atteints d'ellyptocytose héréditaire (n=3) et de CDA II (n=1) ont été inclus ainsi que les anémies hémolytiques de cause inexpliquée (n=2) (tableau 6).

Groupes de patients	**Nombre de patients**
- Groupe 1 : contrôle	44
- Groupe 2 : sphérocytose héréditaire	21
- Groupe 3 : elliptocytose héréditaire	3
- Groupe 4 : thalassémie	1
- Groupe 5 : drépanocytose	3
- Groupe 6 : déficit en G6PD	4
- Groupe 7 : CDA II	1
- Groupe 8 : hémolyse de cause inexpliquée	2

Tableau 6. Classification des patients de l'étude

Les sujets normaux (n = 44) proviennent de volontaires sains ou de patients hospitalisés présentant un hémogramme normal. Des groupes de patients présentant des anémies sans relation avec des défauts du cytosquelette sont également inclus afin de tester la spécificité de la méthode.

Tous les échantillons ont été prélevés sur des tubes contenant de l'EDTA et conservés à + 4°C.

2.2. Paramètres de l'hémogramme

Les paramètres de l'hémogramme ont été déterminés avec l'automate Advia 2120 (Siemens). Avec cet automate, les globules rouges sont analysés par diffraction laser deux angles. La mesure de la diffraction laser grand angle permet d'obtenir la concentration en hémoglobine. L'automate rend donc une CCMH calculée et une CCMH mesurée. Un écart entre la CCMH calculée et la CCMH mesurée supérieur ou égal à 2 déclenche une alarme. Cette alarme est retrouvée en cas de lactescence, d'hémolyse du plasma, en cas d'agglutinines froides ou de sphérocytose héréditaire.

L'automate signale la présence de cellules hyperdenses par une alarme « HYPER ».

2.3. Résistance osmotique globulaire

Le patient ne doit pas avoir été transfusé dans les 3 mois qui précèdent la demande.

Le sang veineux périphérique est recueilli dans un tube contenant de l'héparine-lithium (bouchon vert) et conservé à +4°C.

L'examen doit être démarré le jour du prélèvement et un témoin est toujours prélevé et traité en parallèle.

2.2.1 Test avant incubation :

L'analyse d'un témoin est réalisée systématiquement en parallèle.

▪ Etablir une gamme de solutions salines allant de 0 g/L à10 g/L selon le tableau (=14 tubes)

Tubes	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
Solution fille (mL)	**0**	**1,4**	**1,6**	**1,8**	**2,0**	**2,2**	**2,4**	**2,6**	**2,8**	**3,0**	**3,2**	**3,4**	**3,6**	**5**
Eau purifiée (mL)	**5**	**3,6**	**3,4**	**3,2**	**3,0**	**2,8**	**2,6**	**2,4**	**2,2**	**2,0**	**1,8**	**1,6**	**1,4**	**0**
NaCl en g/L (concentration estimée)	**0**	**2,8**	**3,2**	**3,6**	**4,0**	**4,4**	**4,8**	**5,2**	**5,6**	**6,0**	**6,4**	**6,8**	**7,2**	**10**

▪ Distribuer la solution fille, puis l'eau purifiée et homogénéiser chaque tube par 3 retournements successifs.

▪ Ajouter 50 µL de sang dans chacun des tubes.

▪ Mélanger de nouveau par retournements (au moins 3)

▪ Laisser 30 min au repos à la température du laboratoire.

▪ Centrifuger à 1730 g durant 5 min à 20°C.

▪ Lire la DO (absorbance) du surnageant de chaque tube à 540nm.

2.2.2. Test après incubation 24h à 37 °C :

Les tubes de sang témoin et patient sont maintenus 24h dans un bain-marie à 37°C. La résistance osmotique des hématies incubées à 37°C durant 24h est considérablement altérée. Le test est réalisé de façon identique, mais il est nécessaire d'inclure 3 tubes supplémentaires à la gamme (7,6 - 8 - 8,4 g/L)

Tubes	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**
Solution fille (mL)	**0**	**1,4**	**1,6**	**1,8**	**2,0**	**2,2**	**2,4**	**2,6**	**2,8**	**3,0**	**3,2**	**3,4**	**3,6**	**3,8**	**4,0**	**4,2**	**5**
Eau purifiée (mL)	**5**	**3,6**	**3,4**	**3,2**	**3,0**	**2,8**	**2,6**	**2,4**	**2,2**	**2,0**	**1,8**	**1,6**	**1,4**	**1,2**	**1**	**0,8**	**0**
NaCl en g/L (concentration estimée)	**0**	**2,8**	**3,2**	**3,6**	**4,0**	**4,4**	**4,8**	**5,2**	**5,6**	**6,0**	**6,4**	**6,8**	**7,2**	**7,6**	**8**	**8,4**	**10**

2.2.3. Calcul des pourcentages d'hémolyse :

Le pourcentage d'hémolyse est calculé pour chacun des tubes avant et après incubation à 37°C : Pourcentage hémolyse = (DO échantillon / DO tube témoin ou patient) x 100.

Les résultats sont rendus sous la forme d'un graphique comportant en abscisse la concentration en NaCl et en ordonnée le pourcentage d'hémolyse. Le programme Excel représente la résistance osmotique du témoin et du patient et calcule automatiquement les concentrations en NaCl correspondant à l'hémolyse initiale, l'hémolyse à 50% et l'hémolyse totale pour le témoin et le patient avant incubation et après incubation 24h à 37°C.

Les « valeurs habituelles avant et après incubation » obtenues au laboratoire par analyse de séries de sangs témoins, apparaissent en grisé sur le graphique. Lorsque les courbes obtenues sont situées dans ces valeurs la résistance osmotique des hématies est normale. Lorsque les courbes obtenues sont situées en avant de ces valeurs la résistance osmotique des hématies est diminuée. Lorsque les courbes obtenues sont situées en arrière de ces valeurs la résistance osmotique des hématies est augmentée (figure 25).

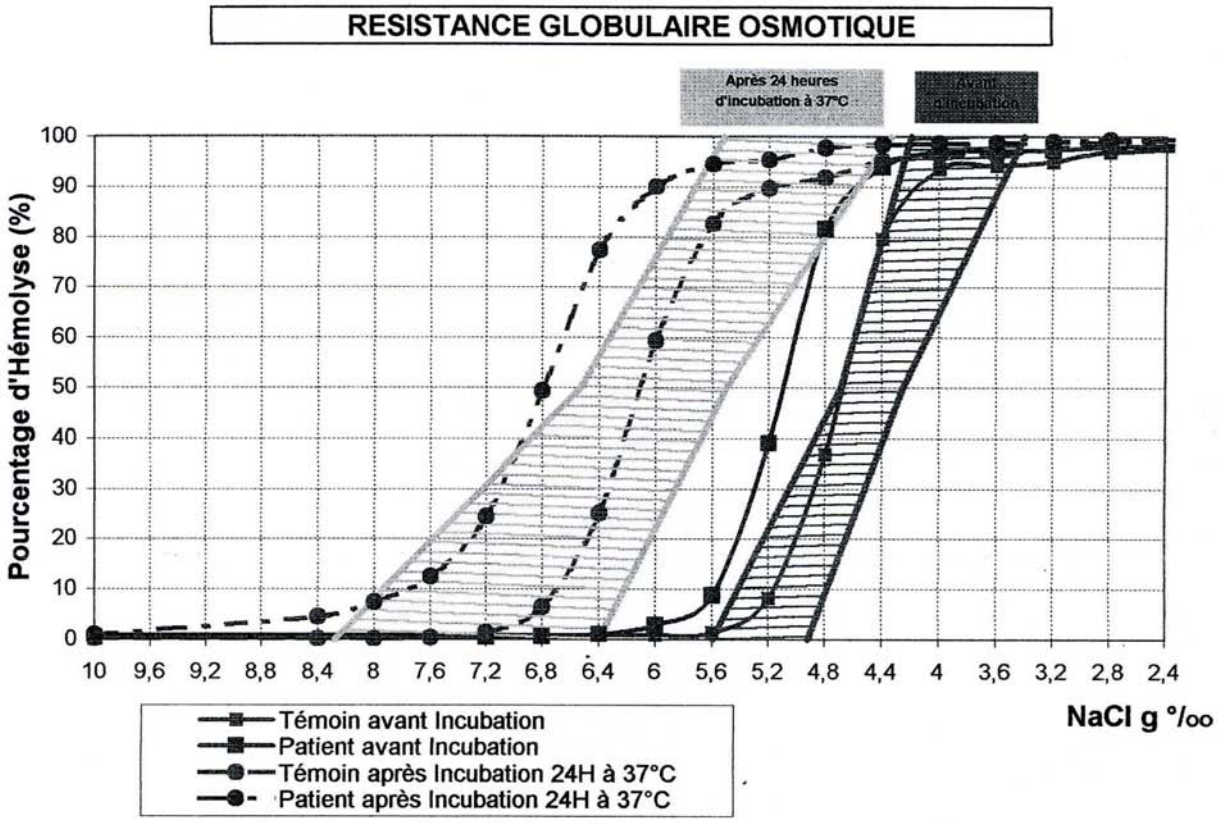


Figure 25. Etude de la résistance globulaire osmotique d'un témoin et d'un patient atteint de SH

2.4. Liaison des globules rouges avec l'EMA et analyse en cytométrie en flux

Les échantillons des patients sont traités en parallèle avec 6 témoins ayant des paramètres hématologiques normaux, pour chaque nouvelle série.

Les globules rouges sont lavés 3 fois avec de l'eau physiologique à 0,9 % de chlorure de sodium. 5 µL du culot globulaire sont alors incubés avec 25 µL d'EMA pendant 1 heure à l'abri de la lumière et à température ambiante. Puis les globules rouges sont lavés 3 fois avec 500 µL de mélange PBS/BSA (albumine bovine fraction V) à 0,5 % et remis en suspension dans 500 µL de PBS/BSA. Pour l'analyse en cytométrie en flux, 100 µL de cette suspension sont dilués dans 2 mL de PBS/BSA. L'intensité de fluorescence en unités IMF (Intensité Moyenne de Fluorescence) est déterminée pour 15 000 évènements dans la fenêtre des globules rouges dans le canal FL-1 du cytomètre FACSCalibur (Becton Dickinson). L'acquisition se fait à l'aide du logiciel CellQuest.

Chaque échantillon est passé en double. La fluorescence du patient est comparée à la moyenne de fluorescence des 6 témoins et un pourcentage de réduction de fluorescence est calculé avec la formule suivante : (IMF témoin – IMF malade)/ IMF témoin.

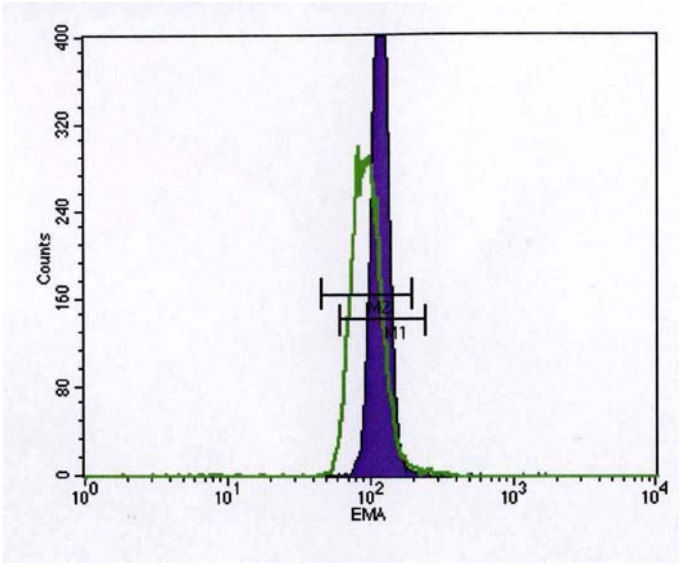


Figure 26. Overlay des histogrammes de fluorescence des globules rouges marqués par l'EMA d'un sujet témoin et d'un patient atteint d'une SH

2.5. SDS-PAGE

Le sang veineux périphérique est recueilli dans 2 tubes contenant de l'héparine lithium (bouchon vert) et conservés à +4°C. L'analyse peut être différée jusqu' 5 jours. Un témoin est toujours prélevé et traité en parallèle.

- Lavage des globules rouges
- Préparation des stromas :

  a) Isolement des culots de stromas

  b) Dosage des protéines du stroma par spectrophotométrie

  Il faut ajuster la concentration du culot de stromas à 4 g/L en protéines totales.

  c) Congélation de la suspension de stromas

  La suspension de stromas ajustée à 4 g/l de protéines totales est repartie en aliquotes de 1 mL dans des microtubes et congelée à -80°C jusqu'à utilisation.

- Préparation des gels avec gradient linéaire de 4 à 8 % d'acrylamide par le laboratoire



Figure 27. Photographie du système de préparation des gels d'acrylamide au laboratoire d'exploration fonctionnelle cellulaire au CHU de Nancy

- Electrophorèse

  a) Prémigration sous circulation basse pendant 45 minutes à 120 mA

  b) Dépôts et migration des échantillons de stroma

  c) Coloration par du bleu de Coomassie et décoloration

  d) Lecture des gels avec le densitomètre Hyrys 2 Sebia : on obtient un protéinogramme pour chacun des dépôts.

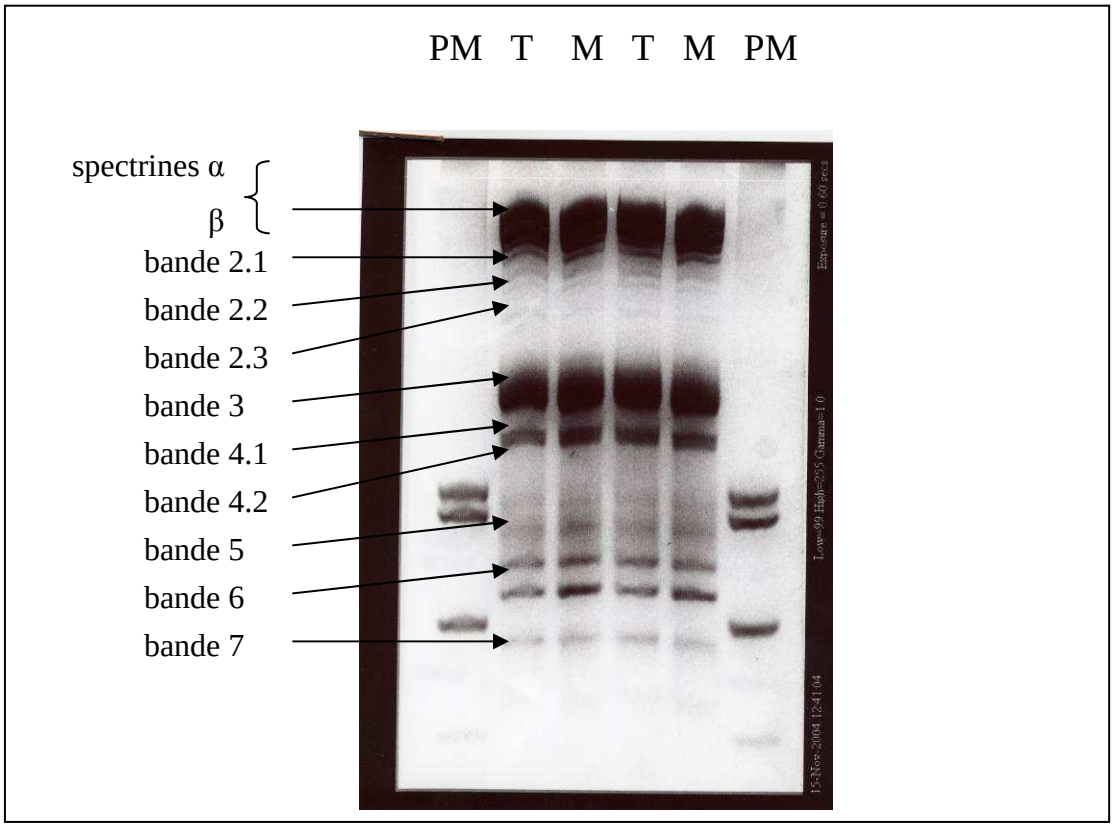


Figure 28. Photographie d'un gel d'acrylamide après migration et coloration par du bleu de Coomassie

- Résultats

Un programme Excel calcule pour chaque protéine « patient » le pourcentage d'écart par rapport à la valeur témoin à partir des valeurs des aires (intégrale) « témoin » et « patient ».

A l'état physiologique, les principales protéines du cytosquelette mises en évidence par électrophorèses sont :

Protéine	**% ± 2 σ (n = 12)**
Spectrine alpha	14,4 – 20,0
Spectrine béta	10,3 – 17,1
Ankyrine (protéine 2.1)	2,6 – 4,2
Bandes de dégradation de l'ankyrine (protéines 2.2 - 2.3 - 2.6)	3,8 – 5,4
Protéine bande 3	20,0 – 32,9
Protéine 4.1	3,4 – 6,0
Protéine 4.2	2,8 – 5,0
Protéine 4.9	3,8 – 6,0
Bande 5	3,0 – 7,2
Bande 6	3,3 – 5,5
Bande 7	1,9 – 4,9

2.6. Analyse statistique

Les résultats de la cytométrie en flux sont exprimés en IMF. L'intervalle de confiance à 95 % correspond à la moyenne ± (1,96 x écart-type).

Quand un test conduit à des résultats quantitatifs continus (cas de la majorité des tests biologiques), il est nécessaire de définir un seuil (ou valeur seuil) permettant de classer le résultat en normal (S-) ou anormal (S+). Le choix de cette valeur seuil influencera la sensibilité et la spécificité du test et donc ses valeurs prédictives. Dans le cas hypothétique d'un test parfait, les distributions des résultats du test chez les sujets malades (M+) et non malades (M-) ne se superposent pas et la valeur seuil du test est située entre ces deux distributions. Tous les sujets seront classés correctement à l'aide du test : la sensibilité et la spécificité sont de 100 %. Malheureusement, pour la majorité des tests, les distributions des résultats des sujets (M+) et (M-) présentent une zone de chevauchement. Tout choix de valeur seuil conduira dès lors à des erreurs de classifications : certains sujets malades (M+) seront classés non malades (S-), d'autres seront considérés comme malades (S+) alors qu'ils ne le sont pas (M-). Une diminution du seuil entraîne une diminution du nombre de faux négatifs (d'où une augmentation de la sensibilité) mais aussi une augmentation du nombre de faux positifs (donc une diminution de la spécificité). Inversement, une augmentation du seuil est accompagnée d'une diminution des faux positifs (augmentation de la spécificité) et d'une augmentation des faux négatifs (diminution de la sensibilité). Ainsi, sensibilité et spécificité varient inversement. Chaque seuil possède des valeurs de sensibilité et de spécificité qui lui sont propres et qui ne décrivent en aucun cas les performances du test à d'autres valeurs seuils.

La courbe ROC (Receiver Operating Characteristics) est une représentation graphique de la relation existante entre la sensibilité et la spécificité d'un test pour toutes les valeurs seuils possibles. L'ordonnée représente la sensibilité et l'abscisse correspond à la quantité (1 – spécificité). Sa construction est facilitée par l'emploi d'un logiciel de calcul spécialisé. Pour construire notre courbe ROC, nous avons utilisé le logiciel informatique SPSS 13.0.

Dans tous les cas, la méthode de travail est identique. Les résultats du test sont classés par ordre croissant et pour chaque valeur, un tableau de contingence identique au tableau 9 est réalisé. On en déduit la sensibilité et la spécificité du test pour chaque valeur obtenue. Les couples {1 – spécificité, sensibilité} sont alors placés sur la courbe. Leur jonction par des lignes droites conduit à un tracé en marches d'escaliers reliant le coin inférieur gauche du

graphique (Se = 0 et Sp = 1) au coin supérieur droit (Se = 1 et Sp = 0). Pour chaque valeur seuil, l'inclusion d'un vrai positif accroît la sensibilité du test. Graphiquement, la jonction du nouveau point avec le point précédemment obtenu est une ligne verticale. À l'inverse, l'inclusion d'un faux positif, à l'origine d'une diminution de la spécificité, produit une ligne horizontale. La résultante au niveau de la courbe ROC est une diagonale, c'est-à-dire la combinaison d'une ligne verticale et d'une ligne horizontale.

L'exploitation d'une courbe ROC débute par une étude de son allure générale et par la détermination de l'aire sous la courbe (ASC) associée.

Dans le cas d'un test parfait (comme celui présenté), la courbe ROC passe par le point de coordonnées {0, 1} (Sp = 1, Se = 1), l'aire sous la courbe associée est 1. À l'inverse, si les distributions des résultats des sujets malades et des sujets sains se superposent parfaitement, la sensibilité est égale à la quantité (1 – spécificité) pour toutes les valeurs du test. La courbe ROC résultante est une diagonale reliant l'extrémité inférieure gauche à l'extrémité supérieure droite du graphique. La surface sous la courbe est de 0,5 : le test est qualifié d'apport nul. Une surface inférieure à 0,5 est obtenue pour un test dont la réponse est inversée (un sujet malade présente un résultat inférieur à un sujet non malade), une surface nulle étant caractéristique d'un test inversé parfait.

L'aire sous la courbe permet d'évaluer l'intérêt diagnostique d'un test. On distingue les tests d'apport nul (ASC = 0,5), peu informatifs ($0,5 \leq ASC < 0,7$), moyennement informatifs ($0,7 \leq ASC < 0,9$), très informatifs ($0,9 \leq ASC < 1$) et parfaits (ASC = 1).

La courbe ROC permet également de déterminer la valeur seuil optimale d'un test. Intuitivement, celle-ci peut être identifiée comme étant le point de la courbe le plus éloigné de la diagonale représentant le test d'apport nul. Ce point correspond également au maximum de l'indice de Youden (Se + Sp –1). Cependant, la recherche d'un seuil nécessite idéalement la prise en compte de données épidémiologiques (prévalence de la maladie) et médico-économiques (coût du traitement, coût des effets indésirables du traitement...). Si une maladie possède un traitement onéreux aux effets secondaires potentiellement graves, il convient de limiter au maximum le nombre de faux positifs, donc de choisir une spécificité élevée. La valeur seuil sera située dans ce cas dans la partie inférieure gauche de la courbe ROC. À l'inverse, certaines maladies possèdent des complications graves qui peuvent être évitées si un traitement simple est mis en place précocement : le test doit posséder une sensibilité élevée. La valeur seuil se situera au niveau de la partie supérieure droite de la courbe ROC[91].

3. Résultats

3.1. Reproductibilité

La reproductibilité des résultats est dépendante de la stabilité de l'EMA, de la concentration utilisée, du temps d'incubation, des conditions de conservation des échantillons de sang et du délai avant le passage sur le cytomètre des globules rouges marqués. Tous ces paramètres ont déjà été étudiés par King et coll.[9].La solution d'EMA à 1 mg/mL dans du PBS est stable si elle est conservée à -20°C jusqu'à 4 mois. La concentration d'EMA recommandée est 0,5 mg/mL et le temps d'incubation est d'une heure (cf. matériels et méthodes). L'intensité de fluorescence des échantillons de globules rouges marqués par l'EMA dans du PBS/BSA reste stable à 4°C pendant 48 heures. Kedar et coll.[79] ont démontré que la solution d'EMA dans du PBS en petits aliquots conservés à – 80°C dans le noir reste stable plus de 4 mois.

3.1.1. Etude de la stabilité de l'EMA au cours du temps

L'EMA (laboratoire Molecular Probe) est conditionné en poudre. Le flacon se conserve au congélateur à – 20°C.

Une solution à 0,5 mg/mL est préparée à partir du flacon de poudre dans du PBS. La solution est aliquotée dans des cupules en plastique de 400 µL. Les aliquots prêts à l'emploi sont conservés au congélateur à – 80 °C. La solution est environ stable 4 mois ou plus. Toutefois, il faut surveiller la diminution de la fluorescence.

6 contrôles (patients du jour normaux) sont passés pour chaque aliquot décongelé. Un aliquot décongelé ne se conserve pas. Une perte de fluorescence de 40 à 60 % est observée en utilisant un aliquot d'EMA décongelé la veille (annexe 1). La moyenne et l'écart-type sont calculés. Les contrôles ne doivent pas sortir de l'intervalle de valeurs compris entre ($m + 2\sigma$) et ($m - 2\sigma$).

La courbe ci-dessous (figure 29) montre une bonne répartition des valeurs de chaque côté de la moyenne.

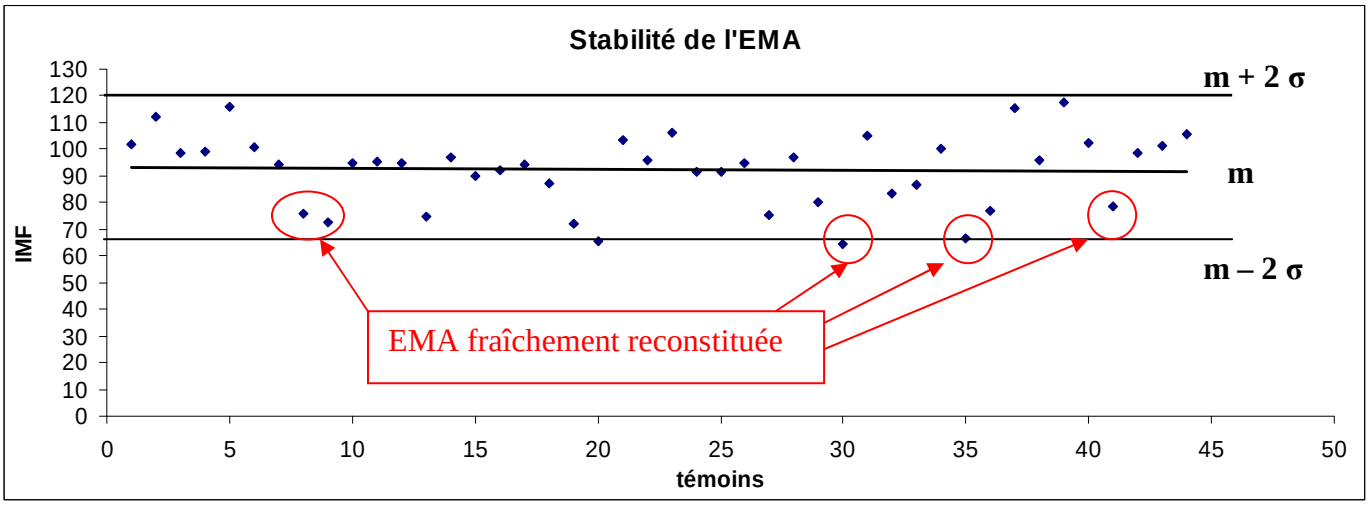


Figure 29. Contrôle de la stabilité de la fluorescence de l'EMA (m : moyenne = 92,4 ; σ : écart-type = 13,6 ; m + 2 σ = 119,5 ; m – 2 σ = 65,1 ; points entourés en rouge = solution d'EMA fraîchement reconstituée)

Il est intéressant de noter que lorsque la solution d'EMA est fraîchement reconstituée, les valeurs d'IMF sont plus basses. La solution d'EMA a peut-être besoin de se stabiliser avant utilisation. Cependant, cela n'affecte pas les résultats car il s'agit d'un rapport entre les IMF du patient et des témoins.

3.1.2. Etude de la stabilité de l'EMA après marquage des globules rouges

Nous avons étudié la stabilité de l'intensité de fluorescence des échantillons de globules rouges marqués par l'EMA dans du PBS/BSA après 48 heures à 4°C.

témoin	IMF	IMF + 48 h	moyenne	écart-type	CV
1	102,25	103,14	102,70	0,63	0,6
2	104,70	108,60	106,65	2,76	2,6
3	102,78	104,29	103,54	1,07	1,0
4	96,04	98,70	97,37	1,88	1,9
5	105,60	108,66	107,13	2,16	2,0
6	100,36	102,36	101,36	1,41	1,4

Tableau 7. Stabilité de l'intensité de fluorescence de 6 témoins après marquage des globules rouges par l'EMA et conservation 48 heures à 4°C

Les coefficients de variation obtenus varient entre 0,6 et 2,6 %, ce qui est faible. L'intensité de fluorescence reste donc stable 48 heures à 4°C après le marquage par l'EMA.

3.1.3. Variation intra-individuelle

Un même échantillon a été passé plusieurs fois par le même technicien dans les mêmes conditions techniques.

On obtient un coefficient de variation moyen de 2,2 % (tableau 8). Cette technique est donc très reproductible.

témoins	IMF 1	IMF 2	moyenne	écart-type	CV (%)
1	111,94	107,87	109,9	2,9	2,6
2	118,18	113,81	116,0	3,1	2,7
3	122,78	125,71	124,2	2,1	1,7
4	101,71	111,76	106,7	7,1	6,7
5	111,34	109,17	110,3	1,5	1,4
6	100,05	100,37	100,2	0,2	0,2
7	103,58	103,18	103,4	0,3	0,3
8	93,71	94,33	94,0	0,4	0,5
9	89,21	93,55	91,4	3,1	3,4
10	106,47	100,76	103,6	4,0	3,9
11	114,52	116,38	115,5	1,3	1,1
12	79,18	77,57	78,4	1,1	1,5

Tableau 8. Etude de la variation intra-individuelle

3.2. Résultats des différents groupes de patients

Les paramètres de l'hémogramme, les résultats de la résistance globulaire osmotique, de l'électrophorèse des protéines de la membrane et de la cytométrie en flux sont résumés dans le tableau de l'annexe 3 pour les différents groupes de patients inclus.

L'âge moyen des patients atteints de sphérocytose héréditaire inclus est de 9,16 ans. 12 patients atteints de sphérocytose héréditaire sur 21 (soit 57 %) présentent une anémie. Chez la moitié de ces patients, l'anémie est microcytaire. 13 patients sur 21 (soit 62 %) ont une CCMH calculée supérieure à 36 g/dL, par contre 19 patients sur 20 (soit 95 %) ont une CCMH mesurée supérieure à 36 g/dL. 7 patients sur 20 (soit 35 %) présentent un écart supérieur ou égal à 2 entre les CCMH mesurée et calculée. 100 % des patients ont un taux de cellules hyperdenses déclenchant l'alarme « HYPER ». 18 patients sur 20 (soit 90 %) ont un taux de réticulocytes supérieur à 120 G/L.

Chez tous les patients atteints de sphérocytose héréditaire, des sphérocytes ont été observés sur le frottis sanguin coloré au MGG.

L'électrophorèse des protéines membranaires n'a été réalisée que chez 7 patients et met en évidence 4 déficits en ankyrine (soit 57,1 %), 2 en protéine bande 3 (soit 28,6 %) et 1 en

spectrine (soit 14,3 %). Ces résultats retrouvent donc par ordre décroissant de fréquence : déficit en ankyrine, déficit en protéine bande 3 et déficit en spectrine ce qui est en accord avec la littérature[13].

Le graphe ci-dessous (figure 30) représente les intervalles de confiance à 95 % des intensités moyennes de fluorescence par groupe de patients. Avec 95 % de confiance, le groupe contrôle (n = 44) a une IMF moyenne de 92,3 ± 4,0. La valeur moyenne d'IMF du groupe SH (n = 21) est significativement plus basse avec 63,4 ± 4,9. Le groupe HE (n = 3) a un intervalle de confiance qui chevauche le groupe contrôle et le groupe SH. L'IMF du seul CDA II inclus est très diminuée par rapport au groupe contrôle.

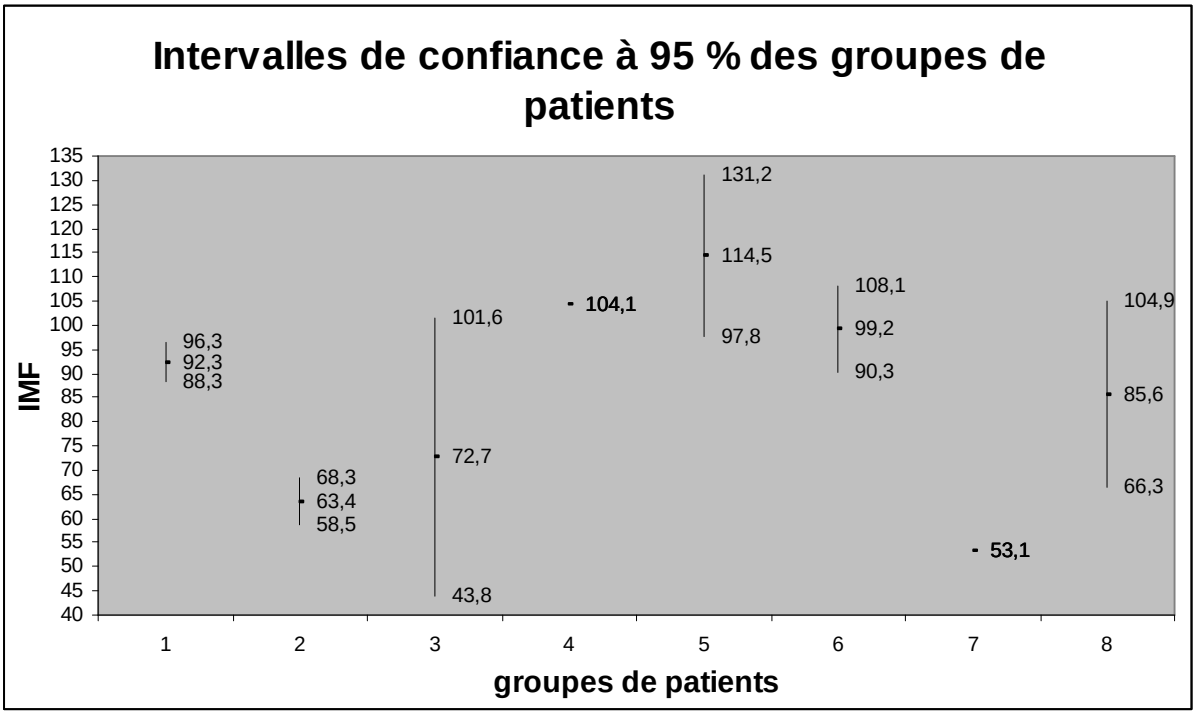


Figure 30. Intervalles de confiance à 95 % des intensités moyennes de fluorescence des 8 groupes étudiés. (1) contrôles (n = 44), (2) SH (n = 21), (3) HE (n = 3), (4) thalassémie (n = 1), (5) drépanocytose (n = 3), (6) déficit en G6PD (n = 4), (7) CDA II (n = 1), (8) hémolyse de cause inexpliquée (n = 2).

Les IMF ne sont pas diminuées chez les patients atteints de thalassémie, drépanocytose, déficit en G6PD et hémolyse de cause inexpliquée.

Parmi les patients atteints de sphérocytose, le patient 34 (annexe 2) a reçu une transfusion 1 mois avant l'analyse par cytométrie en flux. Un double pic est observé sur l'histogramme de fluorescence (figure 31) correspondant aux hématies du sujet et aux hématies transfusées. L'IMF du pic correspondant aux hématies du patient est diminuée (69,4) et le pourcentage de réduction de fluorescence calculé est de 32 %. Une transfusion récente n'empêche donc pas le diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux, contrairement à la résistance osmotique et à l'électrophorèse des protéines membranaires.

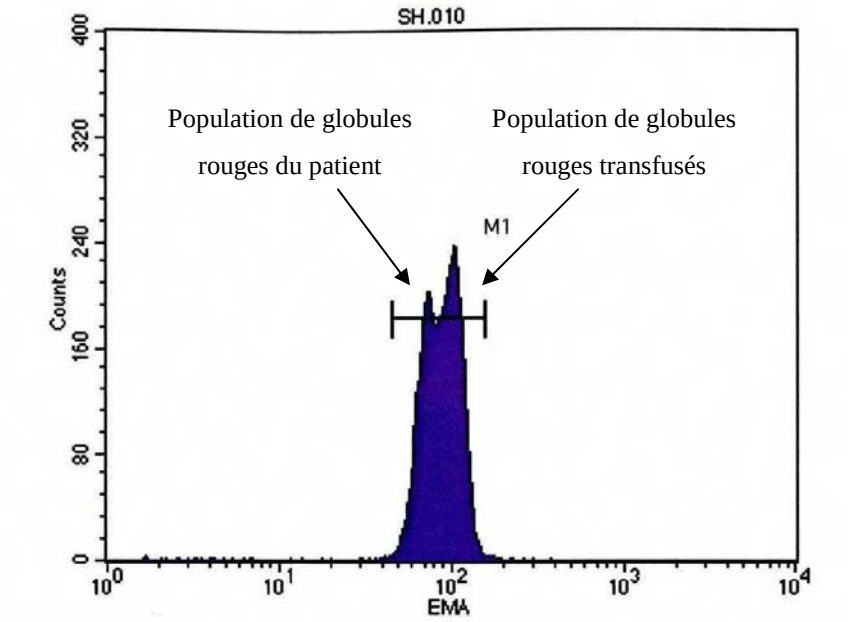


Figure 31. Histogramme de fluorescence des globules rouges marqués à l'EMA d'un patient atteint de SH transfusé 1 mois avant l'analyse

Un contrôle est réalisé 2 mois après et montre la disparition du double pic de fluorescence.
Pour chaque patient testé, le pourcentage de réduction de la fluorescence est calculé. La moyenne ± écart-type de ce pourcentage dans le groupe SH est de 28,7 ± 4,3 %.

3.3. Détermination du seuil optimal et caractéristiques du test

L'aire sous la courbe (ASC) est de 0,95.

La valeur seuil 19,5 % (sensibilité = 1 et spécificité = 0,931) est obtenue en recherchant le point de la courbe le plus éloigné de la diagonale (figure 32) représentant le test "d'apport nul".

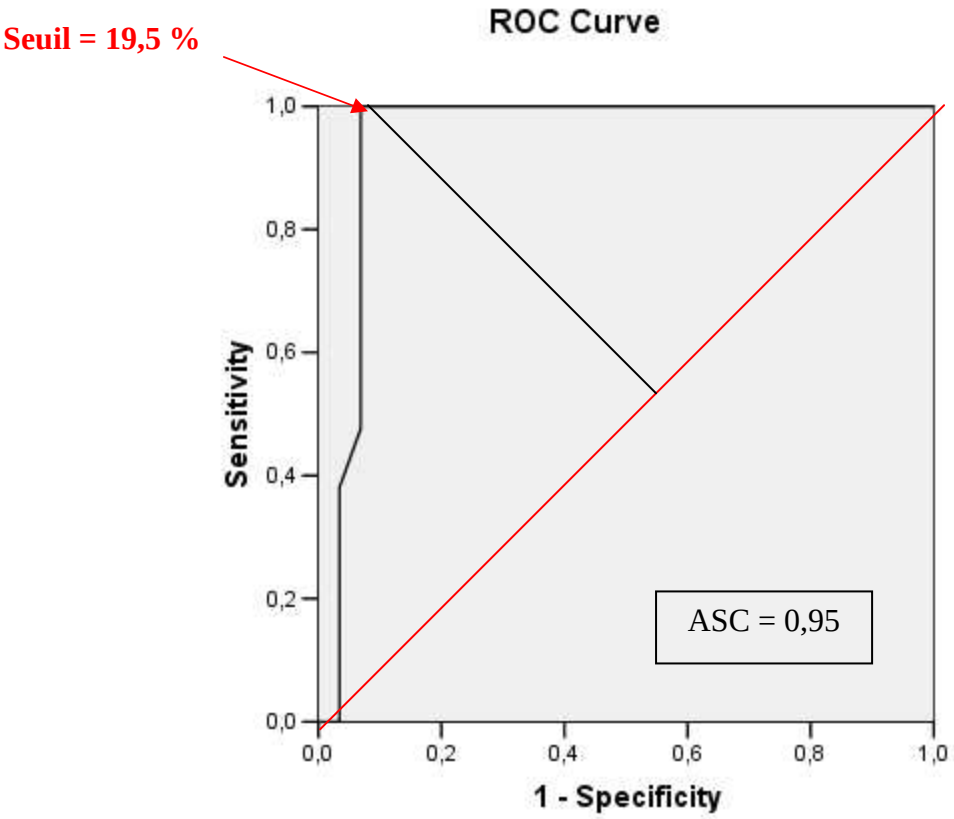


Figure 32. Courbe ROC obtenue avec le logiciel SPSS 13.0 (les coordonnées de la courbe ROC sont présentées dans le tableau de l'annexe 3)

La technique par cytométrie en flux a une sensibilité de 100 % et une spécificité de 93,1 % avec le seuil choisi de 19,5 % (tableau 9).

	SH	**Non SH**	**Total**
Test positif	a (n = 21)	b (n = 2)	a + b (n = 23)
Test négatif	c (n = 0)	d (n = 27)	c + d (n = 27)
Total	a + c (n = 21)	b + d (n = 29)	50

Tableau 9. Sensibilité et spécificité de la cytométrie en flux : sensibilité = a / (a + c) x 100 = 100 % ; spécificité = d / (b + d) x 100 = 93,1 %

L'indice de Youden (Se + Sp – 1) est de 0,931. Plus cet indice se rapproche de 1, plus l'examen est parfait.

La probabilité que le sujet soit réellement malade sachant que son test est positif s'appelle la valeur prédictive positive. De façon analogue, la valeur prédictive négative correspond à la probabilité que le sujet soit réellement indemne si son test est négatif.

La valeur prédictive positive (VPP) du test est VPP = a / (a + b) x 100 = 91,3 % et la valeur prédictive négative (VPN) est VPN = d / (c + d) x 100 = 100 %.

3.4. Corrélation entre la cytométrie en flux et la résistance globulaire

Dans le groupe SH, 7 patients ont eu une résistance osmotique. Seul un patient sur les 7 présente une résistance globulaire normale.100 % des patients de ce groupe sont au-dessus du seuil de 19,5 % pour la cytométrie de flux (annexe 4).

Il existe une corrélation entre la cytométrie en flux et la résistance osmotique globulaire (figure 33, r = 0,64).

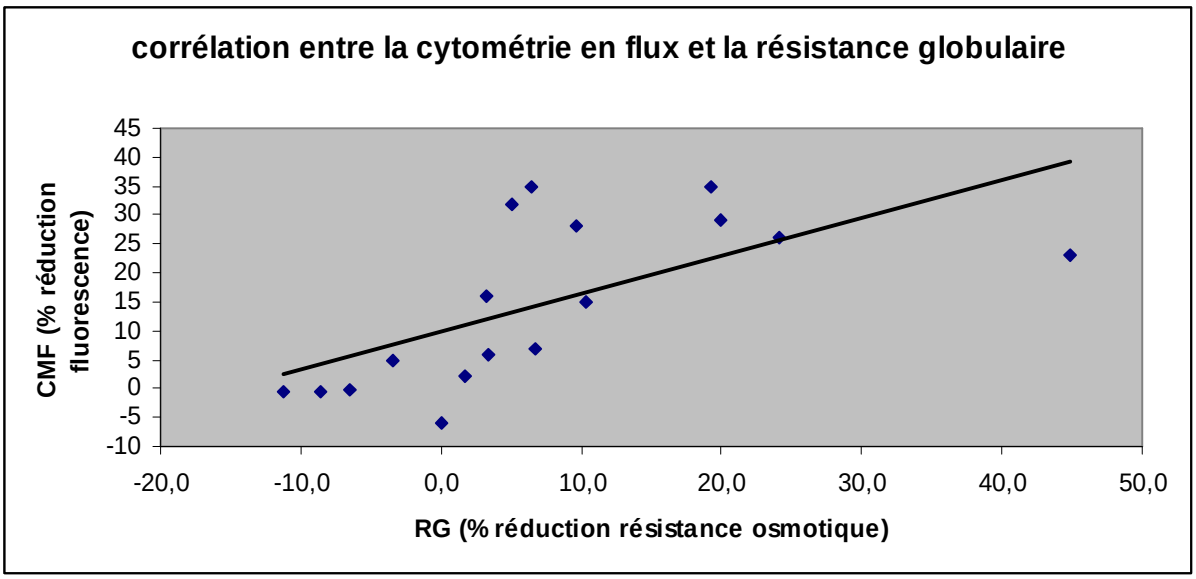


Figure 33. Corrélation entre la cytométrie de flux et la résistance globulaire : r = 0,64

4. Discussion

Le diagnostic de la sphérocytose héréditaire et sa différenciation des autres causes d'hémolyse sont importants pour la prise en charge du patient. Ce diagnostic peut être difficile dans plusieurs situations, par exemple, dans l'association d'une sphérocytose héréditaire et d'une incompatibilité ABO chez le nouveau-né ou encore après une transfusion sanguine, ou dans des formes très modérées de sphérocytose héréditaire.

Jusqu'à présent au laboratoire d'hématologie du CHU de Nancy, le diagnostic de la sphérocytose héréditaire reposait sur l'examen du frottis sanguin, le test de résistance osmotique, le test d'élongation et éventuellement une électrophorèse des protéines de la membrane du globule rouge. Ces trois tests sont longs (plusieurs jours) et délicats à réaliser. De plus ils demandent des quantités de sang importantes et ne peuvent être réalisés dans les trois mois suivant une transfusion.

Parmi les tests utilisés en routine pour le diagnostic de la sphérocytose héréditaire, le test de fragilité osmotique détecte seulement 66 % des patients atteints de sphérocytose héréditaire non splénectomisés, le plus souvent à cause d'un taux de réticulocytes élevé. De plus ce test a une très mauvaise spécificité. Cependant on retrouve une corrélation entre le test de résistance osmotique et la cytométrie en flux ($r = 0,64$), ce qui indique que les deux tests sont utilisables pour identifier les sphérocytoses héréditaires mais avec des sensibilités différentes (respectivement 66 % et 100 %).

L'électrophorèse des protéines (SDS-PAGE) est très spécifique mais a une sensibilité moyenne. Cette technique est très délicate à réaliser et nécessite plusieurs jours de manipulation. Elle ne peut être réalisée systématiquement.

Le diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux après marquage des globules rouges par l'EMA supplante donc tous ces tests avec une excellente sensibilité et spécificité, une mise en œuvre rapide (moins de 2 heures) et facile, à condition de disposer d'un cytomètre en flux. De plus l'analyse peut être différée de plusieurs jours. Cette technique

est tout à fait adaptée aux nouveaux-nés car elle nécessite de faibles quantités de sang (10 µL). Les résultats sont facilement reproductibles si le protocole de marquage des globules rouges et les conditions de stockage de la solution d'EMA sont respectés car l'EMA est photosensible et s'hydrolyse dans un tampon aqueux. Cette méthode est également plus sensible pour détecter une double population de globules rouges (par exemple après une transfusion) car la cytométrie en flux analyse la fluorescence des globules rouges, cellule par cellule.

Parmi les groupes de patients étudiés, un patient avec une elliptocytose héréditaire et un patient avec un CDA II présentent une diminution de la fluorescence significative. Cela vient confirmer des études antérieures décrivant des diminutions significatives de fluorescence pour des cas d'elliptocytose héréditaire[79], de CDA II, de SAO et de cryohydrocytose[9]. Dans notre étude, les 2 autres patients avec une elliptocytose héréditaire ne présentent pas de diminution de la fluorescence et aucun patient atteint de SAO ou de cryohydrocytose n'a pu être testé.
La technique de cytométrie en flux est basée sur la liaison entre l'EMA et le groupement NH2 de la lysine-430 de la première boucle extracellulaire de la protéine bande 3. Donc une réduction de l'intensité de fluorescence indique une réduction quantitative de cette protéine. Cependant l'intensité de fluorescence est également diminuée dans les autres déficits quantitatifs des protéines de la membrane et dans les anomalies membranaires qualitatives dues à une protéine bande 3 aberrante (SAO, CDA II). En effet, la fluorescence est également due à la liaison de l'EMA avec des protéines du complexe Rh. Or la quantité de ces protéines est diminuée dans les sphérocytes par rapport aux globules rouges normaux, ce qui explique la diminution de la fluorescence dans les autres déficits en plus de l'agrégation des protéines bande 3 due aux modifications de l'association du cytosquelette avec la membrane. Toutefois, il existe une controverse sur le déficit en ankyrine. King et coll.[9] trouvent dans leur étude que les sphérocytoses héréditaires par déficit isolé en ankyrine ne sont pas détectées. Ces auteurs suggèrent soit un emplacement de l'ankyrine à l'intérieur du cytosquelette trop éloigné des sites de liaison de l'EMA, soit une « immobilisation » de l'ankyrine dans le cytosquelette. Inversement, plus récemment, Girodon et coll.[81] montrent que tous les patients avec un déficit en ankyrine présentent une réduction de la fluorescence significative. Dans notre étude, les 4 patients avec un déficit en ankyrine sont détectés par la cytométrie en flux. Mais 3 d'entre eux ont un déficit combiné avec la protéine 4.2 (diminution secondaire de la protéine 4.2 témoignant de sa liaison à l'ankyrine).

Le cas du CDA II illustre bien les anomalies qualitatives de la protéine bande 3 entraînant une diminution de la fluorescence comparable à celle retrouvée dans la sphérocytose héréditaire mais sa présentation clinique et les images sur le frottis sanguin sont très distinctes de celles de la sphérocytose héréditaire. La réduction de la fluorescence dans les CDA II est vraisemblablement due à l'inaccessibilité de l'EMA à ses sites de liaison.

Tous les patients atteints de sphérocytose héréditaire testés (21 / 21) présentent des valeurs d'IMF diminuées par rapport aux témoins. Il est important d'utiliser les globules rouges de plusieurs témoins (n = 6) en parallèle du ou des patients à tester dans chaque série afin de réduire la variation intra-essai.

Les valeurs d'IMF des témoins sont très variables d'une étude à l'autre. King et coll.[9] rapporte une moyenne ± écart-type de 53,91 ± 3,24 chez des adultes normaux, tandis que Kedar et coll.[79] trouve une moyenne ± écart-type de 288 ± 28. Nous trouvons dans cette étude une moyenne ± écart-type de 92,3 ± 13,6 dans notre groupe de patients témoins. Ceci montre bien qu'il est important que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs car les cytomètres en flux et leurs réglages varient d'un laboratoire à un autre.

Girodon et coll.[81] trouvent une diminution de la fluorescence de 32,6 ± 10 % dans le groupe SH (moyenne ± écart-type). Nous retrouvons une moyenne ± écart-type de 28,7 ± 4,3 %. Selon l'analyse de leur courbe ROC, ils établissent un seuil de 21 % avec une spécificité de 96 % et une sensibilité de 89 %. Ils ont une zone d'incertitude entre 16 et 21 %. La sensibilité et la spécificité trouvées dans notre étude sont respectivement de 100 % et de 93,1 %, ce qui est en accord avec celles rapportées par king et coll.[9] qui trouvent une sensibilité de 92,7 % et une spécificité de 99,1 %. Avec ce seuil, la valeur prédictive négative est de 100 %, ce qui nous permet d'exclure le diagnostic de sphérocytose héréditaire pour tous les résultats inférieurs au seuil de 19,5 %. Nous n'avons donc pas de zone intermédiaire contrairement à Girodon et coll.[81], King et coll.[9] et Stoya et coll.[80]. Cependant il faut rester prudent sur nos résultats car notre cohorte est de 21 patients atteints de sphérocytose héréditaire seulement.

Bien que cette technique soit hautement prédictive pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire (ASC = 0,95), elle n'est cependant pas corrélée à la sévérité de la maladie[9].

Une nouvelle stratégie diagnostique est élaborée au vu de ces résultats (figure 34). La mesure par la cytométrie en flux de la fluorescence après marquage des globules rouges par l'EMA est proposée en première intention comme diagnostic d'exclusion de la sphérocytose héréditaire. Si le résultat est inférieur à 19,5 %, le diagnostic de sphérocytose héréditaire est éliminé. Si le résultat est supérieur ou égal à 19,5 %, le frottis sanguin doit être examiné afin d'éliminer une elliptocytose héréditaire ou une ovalocytose du sud-est asiatique. En cas de doute, une électrophorèse des protéines de la membrane du globule rouge sera réalisée. Cette stratégie est en accord avec les récentes recommandations pour le diagnostic et la prise en charge de la sphérocytose héréditaire émises par le British Journal of Haematology[22].

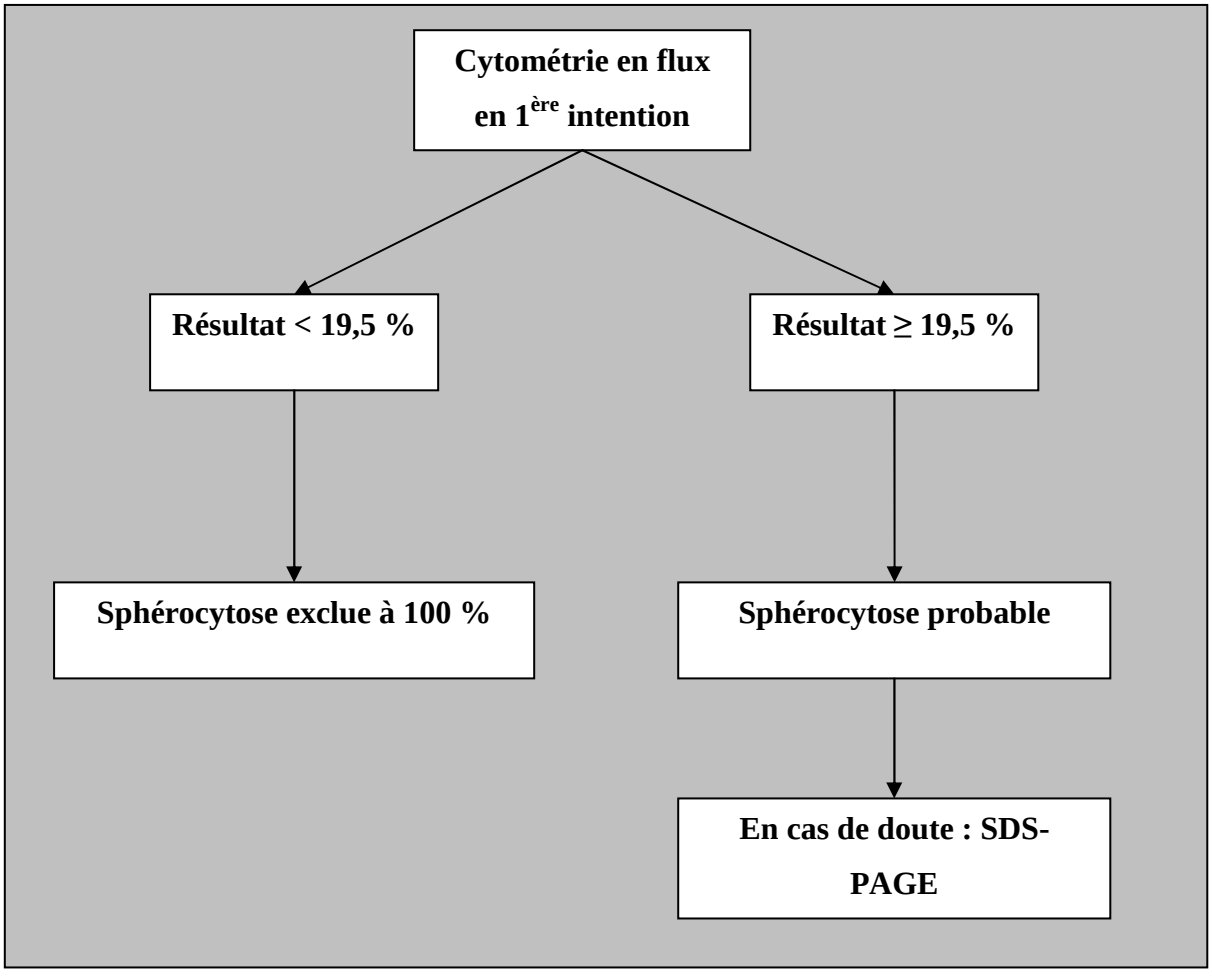


Figure 34. Stratégie diagnostique proposée

En conclusion, ce travail montre que la cytométrie en flux est un outil efficace pour le diagnostic de la sphérocytose héréditaire, quelque soit la nature de la protéine impliquée. Elle est plus sensible que les tests conventionnels, notamment dans les cas de transfusions récentes. De plus, cette technique est particulièrement adaptée aux nouveau-nés en raison des faibles quantités de sang nécessaires et de la rapidité d'obtention des résultats. Par contre, il est essentiel que chaque laboratoire établisse sa propre valeur seuil à cause de la grande variabilité dans la configuration des cytomètres en flux d'un laboratoire à un autre. De même le protocole adapté de celui décrit par King et coll.[9] doit être suivi de manière stricte (conditions de conservation des échantillons et des aliquots de solution d'EMA ; utilisation de 6 témoins adultes comme contrôle à chaque série).

La cytométrie en flux apparaît donc être une technique de choix en première intention dans le diagnostic de la sphérocytose héréditaire, évitant de nombreux examens chronophages et moins sensibles et spécifiques.

ANNEXES :

ANNEXE 1 : étude de la stabilité de l’EMA décongelée

témoins	IMF EMA du jour	IMF EMA+24H	% d'écart
A	101,68	62,04	40
B	99,6	60,43	40
C	106,82	43,25	60

ANNEXE 2 : résultats pour les patients atteints de SH, HE, CDA II, hémolyse de cause inexpliquée, drépanocytose, thalassémie et déficit en G6PD

Patient (âge)	**Hb (g/dL)**	**VGM (fL)**	**CCMHc (g/dL)**	**CCMHm (g/dL)**	**Cell. hyper dense**	**Réticulo (G/L)**	**RG**	**Réd fluo (%)**	**SDS-PAGE**	**Diagnostic**
1 (2a)	8,2	68,8	33,2	34,0		273	NR	2	NR	drépanocytose
2 (6a)	**12,5**	**81,6**	**36,2**	**38,8**	**NR**	**195**	**NR**	**31**	**NR**	**SH connue**
3 (5a)	7,2	59,6	31,2	33,2	+	103	NR	<1	NR	β-thalassémie
4 (6m)	**8,0**	**77,6**	**37,7**	**38,5**	**+++**	**264**	↓	**29**	**ankyrine + 4.2**	**SH connue**
5(16a)	10,8	68,5	33,4	34,5	+	ND	NR	2	NR	drépanocytose
6(15a)	**13,8**	**85,9**	**34,9**	**37,1**	**+++**	**491**	**NR**	**23**	**ankyrine + 4.2**	**SH connue**
7 (1a)	9,5	72,8	35,5	35,0		94	NR	5	NR	déficit en G6PD
8(11a)	10,3	81,8	33,6	34,3	+	58	NR	29	NR	CDA II
9 (5a)	**9,8**	**71,2**	**35,5**	**37,1**	**+++**	**277**	**NR**	**33**	**bande 3 + 4.1**	**SH connue**
10 (4a)	**11,7**	**79,2**	**34,8**	**37,3**	**+++**	**410**	↓	**33**	**bande 3 + 4.2**	**SH connue**
11 (38a)	14,6	105	31,8	30,9		50,4	N	<1	NR	hémolyse inexpliquée
12(9a)	**11,5**	**83 ,6**	**35,5**	**36,9**	**+++**	**167**	↓	**35**	**NR**	**SH probable**
13 (30a)	NR	NR	NR	NR		124	NR	<1	NR	déficit en G6PD
14 (27a)	NR	NR	NR	NR		104	NR	<1	NR	déficit en G6PD
15(9a)	11,3	60,1	30,0	33,6	+	203	NR	37	NR	HE

16(4a)	1,8	110,4	31,4	31,7			NR	<1		
17(8a)	**10,0**	**80,3**	**35,2**	**37,5**	**+++**	**496**	↓	**23**	**NR**	**SH**
18(10a)	11,9	70,6	34,6	38,1	+++	95	NR	<1	NR	drépanocytose
19(8m)	**11,2**	**85**	**38**	**NR**	**NR**	**NR**	**N**	**32**	**NR**	**SH probable**
20(8m)	**7,9**	**88,8**	**36,6**	**38**	**+++**	**115**	↓	**29**	**NR**	**SH probable**
21(9a)	**11,3**	**72,8**	**37,0**	**37,9**	**+++**	**563**	↓	**35**		**SH connue**
22(7a)	**10,8**	**78,6**	**36,5**	**38,0**	**+++**	**372**		**23**		**SH connue**
23(1a)	**12,3**	**86,9**	**34,8**	**35,4**	**++**	**563**	↓	**36**	**ankyrine + 4.2**	**SH**
24(17a)	**13,2**	**88,4**	**36,5**	**37,1**	**+++**	**161**		**24**	**spectrine**	**SH connue**
25(12a)	**13,7**	**85,3**	**37,1**	**37,7**	**+++**	**249**	**NR**	**27**	**NR**	**SH connue**
26(18a)	**14,8**	**87,5**	**36,7**	**38,4**	**+++**	**370**	**NR**	**26**	**NR**	**SH connue**
27(71a)	12,6	90,9	35,0	34,2		296	N	<1	NR	hémolyse inexpliquée
28(16a)	13,9	96,1	34,8	36,3	++	408	N	7	NR	HE
29(9a)	**10,9**	**83,4**	**35,9**	**38,0**	**+++**	**487**	**NR**	**27**	**NR**	**SH connue**
30(17a)	**12,7**	**87,5**	**36,7**	**39,1**	**+++**	**195**	↓	**28**	**NR**	**SH probable**
31(40a)	**12,1**	**91,0**	**36,1**	**38,5**	**+++**	**199**	↓	**26**	**NR**	**SH probable**
32(84a)	8,8	85,1	30,8	32,3		100	N	16	NR	HE
33(13a)	**13,8**	**84,4**	**36,7**	**38,5**	**+++**	**212**	↓	**23**	**bande 2.2**	**SH connue**
* **34(2m)**	**7,6**	**82,9**	**37,3**	**37,6**	**+++**	**100**	**NR**	**32**	**NR**	**SH probable**
34(4m)	**9,4**	**77,2**	**34,4**	**36,9**	**+++**	**447**	**NR**	**28**	**NR**	**SH probable**

a : ans ; m : mois ; CCMHc : CCMH calculé ; CCMHm : CCMH mesuré ; N : normal ; NR : non réalisé ; RG : résistance globulaire

* : patient transfusé 1 mois avant

ANNEXE 3 : Coordonnées des points de la courbe ROC

% reduction fluorescence	Sensibilité	1 - Spécificité
-31,0000	1,000	1,000
-27,5000	1,000	,966
-18,0000	1,000	,931
-10,0000	1,000	,897
-8,0000	1,000	,862
-6,5000	1,000	,828
-4,0000	1,000	,793
-1,5000	1,000	,724
-,5500	1,000	,655
,1500	1,000	,621
,5000	1,000	,586
1,3000	1,000	,552
2,5000	1,000	,448
4,0000	1,000	,414
5,5000	1,000	,345
6,5000	1,000	,310
9,5000	1,000	,241
12,5000	1,000	,207
13,5000	1,000	,172
14,5000	1,000	,138
15,5000	1,000	,103
19,5000	**1,000**	**,069**
23,5000	,842	,069
25,0000	,789	,069
26,5000	,684	,069
27,5000	,579	,069

28,5000	,526	,069
30,0000	,421	,034
31,5000	,368	,034
32,5000	,263	,034
34,0000	,158	,034
35,5000	,053	,034
36,5000	,000	,034
38,0000	,000	,000

ANNEXE 4 : coordonnées des points de la droite de corrélation

% réduction courbe RG	% réduction fluorescence
-8,6	-0,6
3,4	5,7
-11,3	-0,7
0,0	-5,9
19,3	35
44,8	23
5,1	32
20,0	29
-6,5	-0,1
6,5	35
10,3	15
6,7	7
1,7	2
-3,4	5
9,7	28
24,1	26
3,3	16

Bibliographie :

[1] PACKMAN C.H. The spherocytic haemolytic anaemias. British Journal of Haematology, 2001 ; 112 : 888 - 899.

[2] MORTON N.E., MACKINNEY A.A., KOSOWER N., SCHILLING R.F., GRAY M.P. Genetics of spherocytosis. American Journal of Human Genetics, 1962 ; 14 : 170 - 184.

[3] KORONES D., PEARSON H.A. Normal erythrocyte osmotic fragility in hereditary spherocytosis. The Journal of Pediatrics, 1989 ; 27 : 30 - 34.

[4] WARKENTIN T.E., BARR R.D., ALI M.A.M., MOHANDAS N. Recurrent acute splenic sequestration crisis due to interacting genetic defects : haemoglobin SC disease and hereditary spherocytosis. Blood, 1990 ; 75 : 506 - 513.

[5] EBER S.W., PEKRUN A., NEUFELDT A., SCHRÖTER W. Prevalence of increased osmotic fragility of erythrocytes in German blood donors : screening using a modified glycerol lysis test. Annals of Hematology, 1992 ; 64 : 88 - 92.

[6] CYNOBER T., MOHANDAS N., TCHERNIA G. Red cell abnormalities in hereditary spherocytosis : relevance to diagnosis and understanding of the variable expression of clinical severity. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1996 ; 128 : 259 - 269.

[7] STREICHMAN S., GESCHEIDT Y. Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis : correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. American Journal of Hematology, 1998 ; 58 : 206 - 212.

[8] DELAUNAY J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. Blood, 2007 ; 21 : 1 - 20.

[9] KING M.J., BEHRENS J., ROGERS C., FLYNN C., GREENWOOD D., CHAMBERS K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. British Journal of Haematology, 2000 ; 111 : 924 - 933.

[10] DELAUNAY J. Anémies hémolytiques d'origine membranaire. Encyclopédie Médico Chirurgicale (Elsevier Paris), Hématologie, 13-006-D-05, 1999, 7p.

[11] BICHIS M., HUBER A.R. Les maladies héréditaires de la membrane érythrocytaire : du tableau clinique aux mécanismes génétiques et moléculaires sous-jacents. Annales de biologie clinique, 2000 ; 58 : 277 - 289.

[12] HASSOUN H., PALEK J. Hereditary spherocytosis : a review of the clinical and molecular aspects of the disease. Blood Reviews, 1996 ; 10 : 129 - 147.

[13] AN X, MOHANDAS N. Disorders of red cell membrane. British Journal of Haematology, 2008 ; 141 : 367 - 375.

[14] BOIVIN P. Membrane érythrocytaire, structure protéique normale et pathologie constitutionnelle. Maladies héréditaires du globule rouge. Paris : Doin Editeurs, 1984 ; 251p.

[15] MOHANDAS N., AN X. New insights into function of red cell membrane proteins and their interaction with spectrin-based membrane skeleton. Transfusion clinique et biologique, 2006 ; 13 : 29 - 30.

[16] NUNOMURA W., TAKAKUWA Y. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca^{2+} and calmodulin. Frontiers in Bioscience, 2006 ; 11 : 1522 - 39.

[17] AN X.L., TAKAKUWA Y., NUMOMURA W., MANNO S., MOHANDAS N. Modulation of band 3-ankyrin interaction by protein 4.1. The Journal of Biological Chemistry, 1996 ; 271 : 33187 - 33191.

[18] RYBICKI A., SCHWARTZ R., HUSTEDT E., COBB C. Increased rotational mobility and extractability of band 3 from protein 4.2-deficient erythrocyte membranes : evidence of a role for protein 4.2 in strengthening the band 3-cytoskeleton linkage. Blood, 1996 ; 88 : 2745 -2753.

[19] TSE W.T., LUX S.E. Red blood cell membrane disorders. British Journal of Haematology, 1999 ; 104 : 2 - 13.

[20] WOLFE L.C., JOHN K.M., FALCONE J.C., BYRNE A.M., LUX S.E. A genetic defect in the binding of protein 4.1 to spectrin in a kindred with hereditary spherocytosis. New England Journal of Medicine, 1982 ; 307 : 1367 - 1374.

[21] IOLASCON A., MIRAGLIA DEL GIUDICE E., PERROTTA S., ALLOISIO N., MORLE L., DELAUNAY J. Hereditary spherocytosis : from clinical to molecular defects. Haematologica, 1998; 83: 240-257.

[22] BOLTON-MAGGS P.H., STEVENS R.F., DODD N.J., LAMONT P., TITTENSOR P., KING M.J. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. British Journal of Haematology, 2004 ; 126 : 455 - 474.

[23] STENSON P.D., BALL E.V., MORT M., PHILLIPS A.D., SHIEL J.A., THOMAS N.S., ABEYSINGHE S., KRAWCZAK M., COOPER D.N. Human gene mutation database (HGMD): 2003 update. Human Mutation, 2003; 21: 577- 581.

[24] WICHTERLE H., HANSPAL M., PALEK J., JAROLIM P. Combination of two mutant alpha spectrin alleles underlies a severe spherocytic hemolytic anemia. The Journal of Clinical Investigation, 1996 ; 98 : 2300 - 2307.

[25] DELAUNAY J., NOUYRIGAT V., PROUST A., SCHISCHMANOFF P.O., CYNOBER T., YVART J., GAILLARD C., DANOS O., TCHERNIA G. Different impact of alleles α^{LEPRA} and α^{LELY} as assessed versus a novel, virtually null allele of the SPTA1 gene in trans. British Journal of Haematology, 2004 ; 127 : 118 - 122.

[26] WANDERSEE N.J., BIRKENMEIER C.S., GIFFORD E.J., BARKER J.E. Identification of three mutations in the murine erythroid alpha spectrin gene causing hereditary spherocytosis in the mice. Blood, 1998 ; 92 (suppl 1): 8.

[27] HASSOUN H., VASSILIADIS J.N., MURRAY J., NJOLSTAD P.R., ROGUS J., BALLAS S.K., SCHAFFER F., JAROLIM P., BRABEC V., PALEK J. Characterization of the underlying molecular defect in hereditary spherocytosis associated with spectrin deficiency. Blood, 1997 ; 90 : 398 - 406.

[28] BASSERES D.S., VICENTIM D.L., COSTA F.F., SAAD S.T.O., HASSOUN H. β-spectrin promissão: a translation initiation codon mutation of the β-spectrin gene associated with hereditary spherocytosis and spectrin deficiency in a Brazilian family. Blood, 1998 ; 9 1: 368 - 369.

[29] HASSOUN H., VASSILIADIS J.N., MURRAY J., YI S.J., HANSPAL M., JOHNSON C.A., PALEK J. Molecular basis of spectrin deficiency in β-spectrin Durham : a deletion within β-spectrin adjacent to the ankyrin-binding site precludes spectrin attachment to the membrane in hereditary spherocytosis. Journal of Clinical Investigation, 1995 ; 96 : 2623 - 2629.

[30] BECKER P.S., TSE W.T., LUX S.E., FORGET B.G. β-spectrin Kissimmee : a spectrin variant associated with autosomal dominant hereditary spherocytosis and defective binding to protein 4.1. Journal of Clinical Investigation, 1993 ; 92 : 612 - 616.

[31] MIRAGLIA DEL GIUDICE E., LOMBARDI C., FRANCESE M., NOBILI B., CONTE M.L., AMENDOLA G., CUTILLO S., IOLASCON A., PERROTTA S. Frequent *de novo* monoallelic expression of β-spectrin gene (SPTB) in children with hereditary spherocytosis and isolated spectrin deficiency. British Journal of Haematology, 1998 ; 101 : 251 - 254.

[32] JAROLIM P., RUBIN H.L., BRABEC V., PALEK J. Comparison of the ankyrin (AC)n microsatellites in genomic DNA and mRNA reveals absence of one ankyrin mRNA allele in 20 % of patients with hereditary spherocytosis. Blood, 1995 ; 85 : 3278 - 3282.

[33] RANDON J., MIRAGLIA DEL GUIDICE E., BOZON M., PERROTTA S., DE VIVO M., IOLASCON A., DELAUNAY J., MORLE L. Frequent *de novo* mutations of the ANK1 gene mimic a recessive mode of transmission in hereditary spherocytosis : three new ANK1 variants : ankyrins Bari, Napoli II and Aznio. British Journal of Haematology, 1997 ; 96 : 500 - 506.

[34] GALLAGHER P.G., FERREIRA J., COSTA F., SAAD S., FORGET B. A recurrent frameshift mutation of the ankyrin gene associated with severe hereditary spherocytosis. British Journal of Hematology, 2000 ; 111 : 1190 - 1193.

[35] MIRAGLIA DEL GIUDICE E., FRANCESE M., NOBILI B., MORLE L., CUTILLO S., DELAUNAY J., PERROTTA S. High frequency of de novo mutations in ankyrin gene (ANK1) in children with hereditary spherocytosis. The Journal of Pediatrics, 1998 ; 132 : 117 - 120.

[36] EDELMAN E.J., MAKSIMOVA Y., DURU F., ALTAY C., GALLAGHER P.G. A complex splicing defect associated with homozygous ankyrin-deficient hereditary spherocytosis. Blood, 2007 ; 109 : 5491 -5493.

[37] INOUE T., KANZAKI A., KAKU M., YAWATA A., TAKENOZO M., OKAMOTO N et al. Homozygous missense mutation (band 3 Fukuoka : G130R) : a mild form of hereditary spherocytosis with near-normal band 3 content and minimal changes of membrane ultrastructure despite moderate protein 4.2 deficiency. British Journal of Haematology, 1998 ; 102 : 932 - 939.

[38] JAROLIM P., RUBIN H.L., BRABEC V., CHROBAK L., ZOLOTAREV A.S., ALPER S.L., BRUGNARA C., WICHTERLE H., PALEK J. Mutations of conserved arginines in the membrane domain of erythroid band 3 lead to a decrease in membrane-associated band 3 and to the phenotype of hereditary spherocytosis. Blood, 1995 ; 85 : 634 - 640.

[39] ALLOISIO N., MAILLET P., CARRE G., TEXIER P., VALLIER A., BAKLOUTI F., PHILIPPE N., DELAUNAY J. Hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. Association with a non-sense mutation of the band 3 gene (allele Lyon), and aggravation by a low-expression allele occurring in *trans* (allele Genas). Blood, 1996 ; 88 : 1062.

[40] ALLOISIO N., TEXIER P., VALLIER M.L., RIBEIRO L., MORLE., BOZON E., BURSAUX E., MAILLET P., GONCALVES P., TANNER M.J.A., TAMAGNINI G., DELAUNAY J. Modulation of clinical expression and band 3 deficiency in hereditary spherocytosis. Blood, 1997 ; 90 : 414 - 420.

[41] RIBEIRO M.L., ALLOISIO N., ALMEIDA H., GOMES C., TEXIER P., LEMOS C., MIMOSO G., MORLE L., BEY-CABET F., RUDIGOZ R.C., DELAUNAY J., TAMAGNINI G. Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with the total absence of band 3. Blood, 2000 ; 96 : 1602 - 1604.

[42] PERROTTA S., BORIELLO A., SCALONI A., et al. The N-terminal 11 amino acids of human erythrocyte band 3 are critical for aldolase binding and protein phosphorylation : implications for band 3 function. Blood, 2005 ; 106 : 4359 - 4366.

[43] GALLAGHER P.G., FORGET B.G. Hematologically important mutations : band 3 et protein 4.2 variants in hereditary spherocytosis. Blood cells, Molecules and Diseases, 1997 ; 23 : 417 - 421.

[44] CYNOBER T., MIELOT F., SCHISCHMANOFF PO., DELAUNAY J., TCHERNIA G. La sphérocytose héréditaire. Revue Française des Laboratoires, 2000 ; 324 : 45 - 49.

[45] MARGETIS P., ANTONELOU M., KARABABA F., LOUTRADI A., MARGARITIS L., PAPASSIDERI I. Physiologically important secondary modifications of red cell membrane in hereditary spherocytosis-evidence for in vivo oxidation and lipid rafts protein variations. Blood cells, Molecules, and Diseases, 2007 ; 38 : 210 - 220.

[46] INABA M., YAWATA A., KOSHINO I., SATO K., TAKEUCHI M., TAKAKUWA Y., MANNO S., YAWATA Y., KANZAKI A., SAKAI J., BAN A., ONO K., MAEDE Y. Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation. The Journal of Clinical Investigations., 1996 ; 97 : 1804 - 1817.

[47] ROCHA S., REBELO I., COSTA E., CATARINO C., BELO L., CASTRO E.M.B., CABEDA J.M., BARBOT J., QUINTANILHA A., SANTOS-SILVA A. Protein deficiency balance as a predictor of clinical outcome in hereditary spherocytosis. European Journal of Haematology, 2005 ; 74 : 374 - 380.

[48] CAPRARI P., BOZZI A., FERRONI L. Oxidative erythrocyte membrane damage in hereditary spherocytosis. Biochemistry International, 1992 ; 26 : 265 - 274.

[49] ROCHA S., COSTA E., CATARINO C., BELO L., CASTRO E.M.B., BARBOT J., QUINTANILHA A., SANTOS-SILVA A. Erythropoietin levels in the different clinical forms of hereditary spherocytosis. British Journal of Haematology. 2005 ; 131 :534 - 542.

[50] FRIEDMAN E.W., WILLIAMS J.C., VAN HOOK L. Hereditary spherocytosis in the elderly. The American Journal of Medicine, 1988 ; 84 : 513 - 516.

[51] OH S.E., KIM J.H., CHOI C.H., PARK K.H., JUNG J.Y., PARK Y., PARK M.J. An adult with aplastic crisis induced by human parvovirus B19 as an initial presentation of hereditary spherocytosis. The Korean Journal of Internal Medicine, 2005 ; 20: 96 - 99.

[52] PAJOR A., LEHOCZKY D., SZAKACS Z. Pregnancy and hereditary spherocytosis. Report of 8 patients and a review. Archives of Gynecology and Obstetrics. 1993 ; 253 : 37 - 42.

[53] MABERRY M.C., MASON R.A., CUNNINGHAM F.G., PRITCHARD J.A. Pregnancy complicated by hereditary spherocytosis. Obstetrics and gynecology. 1992 ; 79 : 735 - 738.

[54] WHITFIELD C.F., FOLLWEILER J.B., LOPRESTI-MORROW L., MILLER B.A. Deficiency of a spectrin synthesis in burst-forming units erythroid in lethal hereditary spherocytosis. Blood, 1991 ; 78 : 3043 - 3051.

[55] PINTO L., IOLASCON A., MIRAGLIA DEL GIUDICE E., MATARESE SMR., NOBILI B., PERROTTA S. The Italian survey on hereditary spherocytosis. Journal of Pediatric Hematology/Oncology. 1995 ; 2 : 43 - 47.

[56] SAADA V., CYNOBER T., BROSSARD Y., SCHISCHMANOFF P.O., SENDER A., COHEN H., DELAUNAY J., TCHERNIA G. Incidence of hereditary spherocytosis in a population of jaundiced neonates. Pediatric Hematology and Oncology. 2006; 23: 387-397.

[57] IOLASCON A., FAIENZA M.F., MORETTI A. UGT 1 promoter polymorphism accounts for increased neonatal appearance of hereditary spherocytosis. Blood, 1998 ; 1091 : 1093.

[58] DELHOMMEAU F., CYNOBER T., SCHISCHMANOFF O., ROHRLICH P., DELAUNAY J., MOHANDAS N., TCHERNIA G. Natural history of hereditary spherocytosis during the first year of life. Blood, 2000 ; 95 : 393 - 397.

[59] EBER S.W., ARMBRUST R., SCHROTER W., Variable clinical severity of hereditary spherocytosis : relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility and autohemolysis. The Journal of Pediatrics, 1990 ; 117 : 409 - 416.

[60] MIRAGLIA DEL GIUDICE E., PERROTTA S., NOBILI B., PINTO L., CUTILLO L., IOLASCON A. Coexistence of hereditary spherocytosis (HS) due to band 3 deficiency and beta-thalassaemia trait : partial correction of HS phenotype. British Journal of Haematology, 1993 ; 85 : 553 - 557.

[61] USTUN C., KUTLAR F., HOLLEY L., SEIGLER M., BURGESS R., KUTLAR A. Interaction of sickle cell trait with hereditary spherocytosis : splenic infarcts and sequestration. Acta Haematologica, 2003 ; 10 9: 46 - 49.

[62] GRANEL B., SERRATRICE J., REY J, DAVID M., PACHE X., BERNIT E., SWIADER L., DISDIER P., WEILLER P.J. Erythroblastopénie aiguë transitoire intrafamiliale et sphérocytose héréditaire : responsabilité du parvovirus B19. Revue de Médecine Interne, 2001 ; 22 : 664 - 667.

[63] LAMBERT M., SMELLIE S., CHATELAIN C., FERRANT A., DE MEYER R. Acute non-immune haemolytic anaemia during infectious mononucleosis unmasking spherocytosis. Acta Clinica Belgica, 1989 ; 44 : 192 - 195.

[64] TAMARY H., AVINER S.,FREUD E., MISKIN H., KRASNOV T., SCHWARZ M., YANIV I. High incidence of early cholelithiasis detected by ultrasonography in children and young adults with hereditary spherocytosis. Journal of Pediatric Hematology/Oncology, 2003 ; 25 : 952 - 954.

[65] MIRAGLIA DEL GIUDICE E., PERROTTA S., NOBILI B., SPECCHIA C., D'URZO G., IOLASCON A. Coinheritance of Gilbert syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis. Blood, 1999 ; 94 : 2259 - 2262.

[66] BRANDENBERG JB., DEMARMELS BIASIUTTI F., LUTZ HU., WUILLEMIN WA. Hereditary spherocytosis and hemochromatosis. Annals of Hematology, 2002 ; 81 : 202 – 209.

[67] SUTTON C., GARCEA G., MARSHALL L., LLOYD T., DE ALWIS C., LEWIS M. Pelvic extramedullary haematopoiesis associated with hereditary spherocytosis. European Journal of Haematology, 2003 ; 70 : 326 - 329.

[68] GUITTON C., GARCON L., CYNOBER T., GAUTHIER F., TCHERNIA G., DELAUNAY J., LEBLANC T., THURET I., BADER-MEUNIER B. Sphérocytose héréditaire : recommandations pour le diagnostic et la prise en charge chez l'enfant. Archives de Pédiatrie. 2008 [article in press]

[69] MICHAELS L., COHEN A., ZHAO H., RAPHAEL R., MANNO C. Screening for hereditary spherocytosis by use of automated erythrocyte indexes. The Journal of Pediatrics, 1997 ; 130 : 957 - 960.

[70] FUKAWAGA N., FRIEDMAN S., GILL F.M., SCWARTZ E., SHALLER C. Hereditary spherocytosis with normal osmotic fragility after incubation. Is the autohemolysis test really obsolete? The Journal of the American Medical Association, 1979 ; 242 : 63 - 64.

[71] BUCX M.J., BREED W.P., HOFFMANN J.J. Comparison of acidified glycerol test, pink test and osmotic fragility test in hereditary spherocytosis : effect of incubation. European Journal of Haematology, 1988 ; 40 : 227 - 231.

[72] VETTORE L., ZANELLA A., MOLARO G.L., DE MATTEIS M.C., PAVESI M., MARIANI M. A new test for the laboratory diagnosis of spherocytosis. Acta Haematologica, 1984 ; 72 : 258 - 263.

[73] IGLAUER A., REINHARDT D., SCHROTER W., PEKRUN A. Cryohemolysis test as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. Annals of Hematology, 1999 ; 78 : 555 - 557.

[74] ROMERO R.R., POO J.L., ROBLES J.A., URIOSTEGUI A., VARGAS F., MAJLUF-CRUZ A. Usefulness of cryohemolysis test in the diagnosis of hereditary spherocytosis. Archives of Medical Research, 1997 ; 28 : 247 - 251.

[75] CLARK M.R., MOHANDAS N., SHOHET S.B. Osmotic gradient ektacytometry : comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. Blood, 1983 ; 61 : 899 - 910.

[76] COBB C.E., BETH A.H. Identification of the eosinyl-5-maleimide reaction site on the human erythrocyte anion-exchange protein : overlap with the reaction sites of other chemical probes. Biochemistry, 1990 ; 29 : 8283 - 8290.

[77] PAN R.J., CHERRY R.J. Evidence that eosin-5-maleimide binds close to the anin transport site of human erythrocyte band 3 : a fluorescence quenching study. Biochemistry, 1995 ; 34 : 4880 – 4888.

[78] KING M.J., SMYTHE J., MUSHENS R. Eosin-5'-maleimide binding to band 3 and Rh-related proteins forms the basis of a screening test for hereditary spherocytosis. British Journal of Haematology, 2004 ; 124 : 106 - 113.

[79] KEDAR P.S., COLAH R.B., KULKARNI S., GHOSH K., MOHANTY D. Experience with eosin-5'-maleimide as a diagnostic tool for red cell membrane cytoskeleton disorders. Clinical and Laboratory Haematology, 2003 ; 25 : 373 – 376.

[80] STOYA G., GRUHN B., VOGELSANG H., BAUMANN E., LINSS W. Flow cytometry as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. Acta Haematologica, 2006 ; 116 : 186 – 191.

[81] GIRODON F., GARCON L., BERGOIN E., LARGIER M., DELAUNAY J., FENEANT-THIBAULT M., MAYNADIE M., COUILLAUD G., MOREIRA S., CYNOBER T. Usefulness of the eosin-5'-maleimide cytometric method as a first-line screening test for the diagnosis of hereditary spherocytosis : comparison with ektacytometry and protein electrophoresis. British Journal of Haematology, 2008 ; 140 : 464 – 474.

[82] AERTS I. Sphérocytose héréditaire, actualités cliniques et biologiques. 190 pages. Thèse de médecine. Montpellier. 2000 ; 1558466.

[83] MARIANI M., BARCELLINI W., VERCELLATI C., MARCELLO A.P., FERMO E., PEDOTTI P., BOSCHETTI C., ZANELLA A. Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect. Haematologica. 2008. [Epub ahead of print]

[84] LIN C., COTTON F., BOUTIQUE C., DHERMY D., VERTONGEN F., GULBIS B. Capillary gel electrophoresis : separation of major erythrocyte membrane proteins. Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications, 2000 ; 742 : 411 - 419.

[85] KING M.J., TELFER P., MACKINNON H., LANGABEER L., McMAHON C., DARBYSHIRE P., DHERMY D. Using the eosin-5-maleimide binding test in the differential diagnosis of hereditary spherocytosis and hereditary pyropoïkylocytose. Clinical Cytometry, 2008 ; 74 : 244 – 250.

[86] DANISE P., AMENDOLA G., NOBILI B., PERROTTA S., MIRAGLIA DEL GUIDICE E., MATARESE S.M.R., IOLASCON A., BRUGNARA C. Flow-cytometric analysis of erythrocytes and reticulocytes in congenital dyserythropoietic anaemia type II (CDA II) : value in differential diagnosis with hereditary spherocytosis. Clinical and Laboratory Haematology, 2001 ; 23 : 7 – 13.

[87] DELAUNAY J. Anémies dysérythropïétiques congénitales. Orphanet [en ligne]. 2000 [octobre 2003], 3 p. disponible sur : http://www.orpha.net/data/patho/FR/fr-CDA.pdf.

[88] TCHERNIA G., DELHOMMEAU F., PERROTTA S., CYNOBER T., BADER-MEUNIER B., NOBILI B., ROHRLICH P., SALOMON J.L., SAGOT-BEVENOT S., DEL GIUDICE E.M., DELAUNAY J., DEMATTIA D., SCHISCHMANOFF P.O., MOHANDAS N., IOLASCON A. Recombinant erythropoietin therapy as an alternative to blood transfusions in infants with hereditary spherocytosis. The Hematology Journal, 2000 ; 1 : 146 – 152.

[89] RELIENE R., MARIANI M., REINHART W.H., RIBEIRO M.L., MIRAGLIA DEL GIUDICE E., PERROTTA S., IOLASCON A., EBER S., LUTZ H. Splenectomy prolongs in vivo survival of erythrocytes differently in spectrin/ankyrin and band 3-deficient hereditary spherocytosis. Blood, 2002 ; 100 : 2208 – 2215.

[90] BABER-MEUNIER B., GAUTHIER F., ARCHAMBAUD F., CYNOBER T., MIELOT F., DOMMERGUES J.P., WARSZAWSKI J., MOHANDAS N., TCHERNIA G. Long-term evaluation of the beneficial effect of subtotal splenectomy for management of hereditary spherocytosis. Blood, 2001 ; 97 : 399 – 403.

[91] DELACOUR H., SERVONNET A., PERROT A., VIGEZZI J.F., RAMIREZ J.M. La courbe ROC (receiver operating characteristic) : principes et principales applications en biologie clinique. Annales de Biologie Clinique, 2005 ; 63 : 145 – 154.

RESUME : 240 mots, 2000 caractères
La sphérocytose héréditaire, appelée aussi maladie de Minkowsky-Chauffard, est la maladie constitutionnelle du globule rouge la plus fréquente en Europe du Nord et en Amérique du Nord avec une prévalence de 1/5000 naissances. C'est une maladie très hétérogène en ce qui concerne la sévérité clinique, les déficits protéiques et le mode de transmission. Le diagnostic repose sur la clinique, les antécédents familiaux, la présence de sphérocytes sur le frottis sanguin et des tests de confirmation réalisés au laboratoire. Les tests couramment utilisés, tels que le test de résistance osmotique, le test d'autohémolyse, le test de lyse au glycérol acidifié (AGLT) ou le pink test, sont basés sur l'étude de la fragilité osmotique. Ces tests manquent de spécificité et de sensibilité et peuvent passer à côté des formes de sphérocytose héréditaire modérées ou atypiques. La confirmation du diagnostic de sphérocytose héréditaire par SDS-PAGE peut être utile dans certains cas mais ce test n'est pas adapté à la routine et est réalisé dans des laboratoires spécialisés. Récemment, un test par cytométrie en flux basé sur la mesure de la fluorescence due principalement à la liaison de l'éosine-5'-maleimide avec la protéine bande 3 a été proposé comme test de dépistage. Nous avons évalué cette technique en routine au laboratoire et avons établi un seuil de 19,5 % avec une sensibilité de 100 % et une spécificité de 93,1 %. En conclusion, nous proposons cette technique très reproductible avec une sensibilité et une spécificité excellentes, également facile et rapide à mettre en œuvre, en première ligne pour le diagnostic de la sphérocytose héréditaire.

MOTS CLES : sphérocytose héréditaire, maladie de Minkowski-Chauffard, anémie hémolytique congénitale, cytométrie en flux, éosine-5'-maleimide, cytosquelette du globule rouge.