

---

# Réinterprétation des paramètres quantitatifs de l'hémogramme et de la morphologie érythrocytaire pour l'aide au diagnostic étiologique des microcytoses

---

Julian LE GLAUNEC

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Pharmacie

Mémoire du diplôme d'études spécialisées en biologie médicale



# Plan

---

## I. Généralités sur les microcytoses

- 1) La microcytose
- 2) La carence martiale
- 3) Les hémoglobinoses microcytaires
- 4) L'inflammation chronique
- 5) Bilan

## II. Etude

- 1) Objectif
- 2) Matériel et méthodes
- 3) Résultats
- 4) Discussion
- 5) Conclusion



# La microcytose

- Diminution du volume globulaire moyen (ou VGM) des globules rouges d'un individu.
- Le VGM est un paramètre érythrocytaire aidant à préciser l'étiologie d'une anémie.

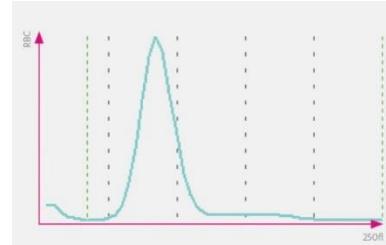
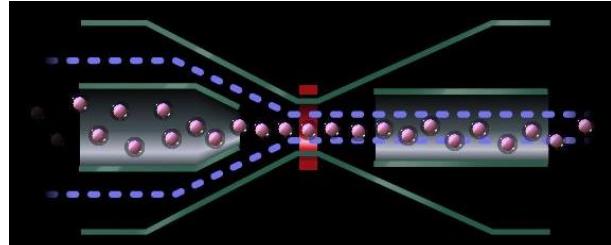
*McPherson et al, Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods, 2017*

- Seuils définis en fonction de l'âge :

- VGM < 70 fL avant 2 ans
- VGM < 73 fL de 2 à 6 ans
- VGM < 80 fL de 6 à 14 ans
- VGM entre 82 et 98 fL chez l'adulte

*Lecture critique de l'hémogramme, ANAES, 2007*

- Mesure du VGM sur l'automate Sysmex XE-5000® par la méthode d'impédance.





# La carence martiale

- **Définition :** Epuisement total des réserves en fer.

*Cook et al, JIM, 1989*

- **Epidémiologie**

- La prévalence de la carence martiale dans le monde est de près de 25%.
- Différentes circonstances de découvertes : **fatigue, maux de tête, perte de cheveux, grossesse, ménométrorragies, ulcères...**

*Levi et al, Eur J Haematol, 2016*

- **Physiopathologie**

- Rôle primordial de l'hepcidine dans l'utilisation du fer par l'organisme

*Lopez et al, Lancet, 2016*

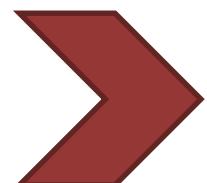
Diminution du fer



Diminution de la  
synthèse d'hémoglobine  
→ Hypochromie



Augmentation du  
nombre de mitoses  
→ Microcytose



Insuffisance de production  
→ Anémie

*Greer, Wintrobe's Clinical Haematology*



# La carence martiale

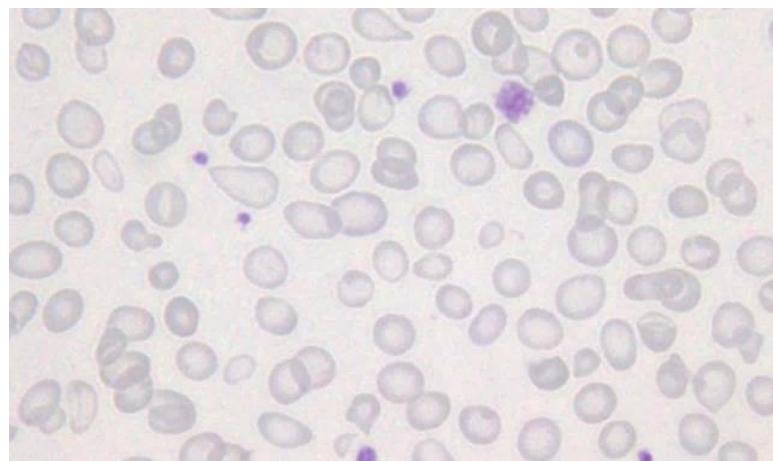
## ■ Diagnostic biologique

### ➤ Profil de l'hémogramme

Une diminution parallèle de l'Hb, du VGM et de la CCMH est généralement décrite

*Archer et al, Crit Rev Clin Lab Sci, 2015*

La présence d'annulocytes est l'anomalie morphologique la plus couramment associée



### ➤ Examens de référence

Ferritine sérique : méthode automatisée et simple à mettre en place.

*Ciangura et al, HAS, 2011*



# Les hémoglobinoSES microcytaires

---

## ■ Définition

- Maladies **constitutionnelles** liées à un **défaut de synthèse** quantitatif ou qualitatif d'une des chaînes de globine.

## ■ Epidémiologie

- Environ **300000** enfants naissent chaque année avec un désordre de l'Hb.
- Au total, plus de 400 millions de personnes thalassémiques dans le monde.

*Weatherall et al, Blood Rev, 2012*

## ■ Physiopathologie

- Défaut de synthèse de l'une des chaînes de globine
- Compensation de production de GR
- Augmentation du nombre de mitoses

*Aydinok et al, Hematology, 2012*



# Les hémoglobinoses microcytaires

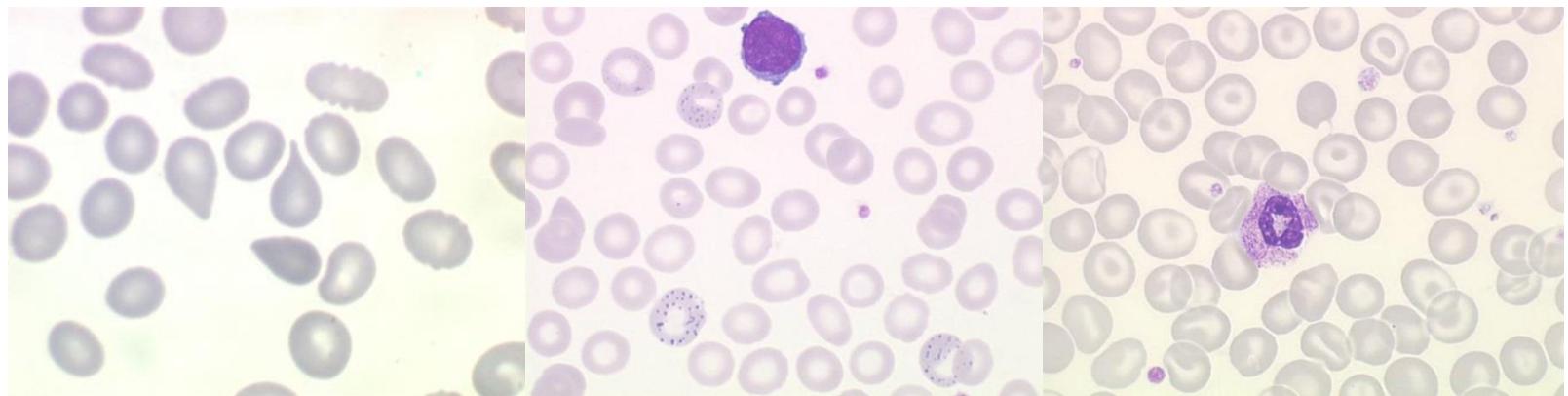
## ■ Diagnostic biologique

### ➤ Profil de l'hémogramme

- Anémie inconstante et +/- marquée en fonction de l'hémoglobinose en cause.
- Diminution du VGM, CCMH normale ou modérément abaissée.
- Les principales anomalies morphologiques observables sur lame sont fonction de la nature de l'hémoglobinose

*Ford et al, ISLH, 2013*

*Bain et al, Blood Rev, 2011*



### ➤ Examens de référence

- 2 techniques électrophorétiques différentes (capillaire + CLHP par exemple) avec NFS et bilan martial
- Une 3<sup>ème</sup> méthode est nécessaire en cas d'anomalie qualitative



# L'inflammation chronique

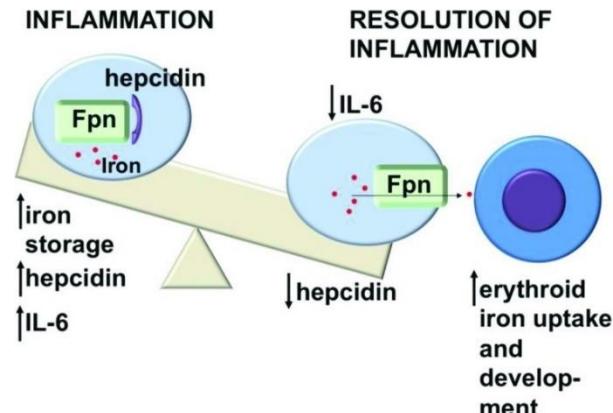
## ■ Définition

- Phase anormale de l'**inflammation**, caractérisée par une **persistance dans le temps**.

## ■ Épidémiologie

- Cancers
- Infections chroniques
- Maladies auto-immunes

## ■ Physiopathologie



*Fraenkel et al, ASH, 2015*

*Fraenkel et al, Med Clin North Am, 2017*

*Thomas et al, Lab Hematol Off Publ Int Soc Lab Hemato, 2005*

## ■ Diagnostic biologique

- Hémogramme
- Anémie modérée normochrome normocytaire qui devient hypochrome et microcytaire chez 1/3 des patients
- *Examens de référence*
- Présence de **marqueurs** non spécifiques de **l'inflammation** (CRP, Fibrinogène...)
- **Exclusion d'une carence martiale** : Récepteur soluble de la Tf

*Cullis et al, Br J Haematol, 2011*



# Bilan :

Carcénoses martiales

Hémoglobinoses  
microcytaires

Etats inflammatoires  
très sévères

- Ont en commun de présenter à l'hémogramme une microcytose et une baisse de l'Hb +/- franches
- Les anomalies morphologiques de chaque situation sont rapportées comme inconstantes et globalement peu utiles au diagnostic
- Ceci peut limiter la capacité à proposer un diagnostic étiologique à partir de l'hémogramme



# Bilan

- *Création d'indices érythrocytaires, issus de calculs mathématiques, pour l'aide au diagnostic étiologique des microcytoses*
- *Plus de 40 existants*
- *Quelques exemples d'équations mathématiques :*

Indice	Formule mathématique
England and Fraser	$VGM - GR - 5 \times Hb - 3,4$
Green and King	$\frac{VGM^2 \times IDR}{Hb \times 100}$
Mentzer	$\frac{VGM}{GR}$
RDW	$\frac{VGM \times IDR}{GR}$
Srivastava	$\frac{TCMH}{GR}$
Shine and Lal	$\frac{VGM^2 \times TCMH}{100}$

- *L'étude de la littérature montre que ces indices ont une bonne sensibilité et une bonne spécificité, mais surtout pour discriminer carences martiales des bêta-thalassémies.*



# Plan

---

## I. Généralités sur les microcytoses

- 1) La microcytose
- 2) La carence martiale
- 3) Les syndromes thalassémiques et autres hémoglobinopathies
- 4) L'inflammation chronique
- 5) Bilan

## II. Etude

- 1) Objectif
- 2) Matériel et méthodes
- 3) Résultats
- 4) Discussion
- 5) Conclusion



# Objectif

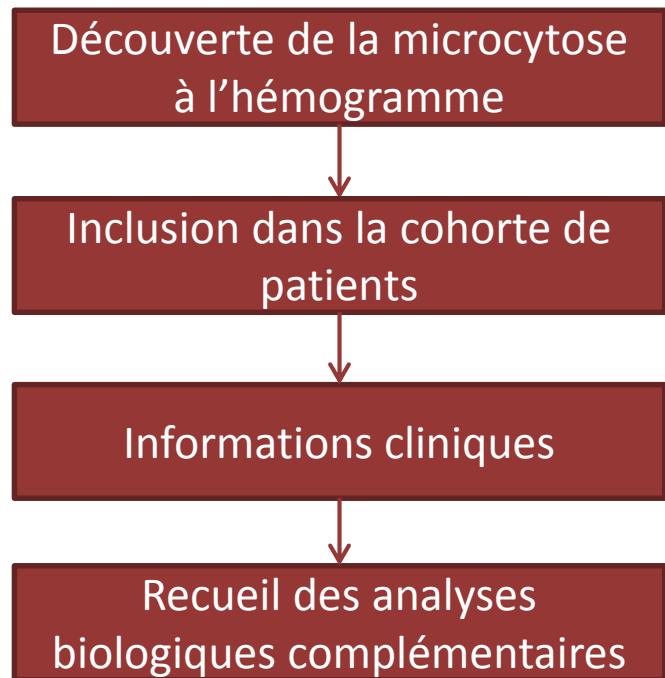
---

- *Orienter le diagnostic étiologique de la microcytose vers la carence martiale ou vers l'hémoglobinopathie à l'aide de l'hémogramme :*
  - Paramètres d'intérêt de la **NFS**
  - **Anomalies morphologiques** remarquables
  - Calculs d'**indices érythrocytaires** existants
  - Apport du **canal « réticulocyte »** de l'automate



# Matériel et méthodes

- **Recueil des données grâce aux internes présents entre Juin et Septembre 2013**
  - Mailys Le Guyader, Rachel Chenouard, Johann Rose et Damien Luque Paz ont travaillé à récupérer toutes les nouvelles microcytoses arrivant au laboratoire, sans antériorité connue.
- **Analyse rétrospective**



- VGM < 70fL entre 6 mois et 2 ans
- VGM < 73fL entre 2 et 6 ans
- VGM < 75fL à partir de 6 ans
- Collecte des données de l'hémogramme
- Lecture du frottis sanguin + relecture par un cytologiste confirmé
- Histoire clinique
- Antécédents personnels, familiaux
- Ajout des examens complémentaires
- Tableau Excel
- Calculs des indices érythrocytaires
- Utilisation d'outils statistiques



# Matériel et méthodes

---

- **Les anomalies morphologiques observées sur le frottis sanguin ont été les suivantes :**

Avec une quantification :

- Annulocytes
- Hématies cibles
- Dacryocytes
- Elliptocytes
- Microcytes

Présence ou absence :

- Hématies ponctuées
- Hématies densifiées
- Pseudo-acanthocytes
- Fish cells
- Drépanocytes



# Matériel et méthodes

---

- **Sur le même modèle, une 2<sup>ème</sup> cohorte de patients a été créée au fil de l'eau sur la période de janvier à début mars 2017**
  - Microcytose découverte à l'hémogramme nécessitant une revue de lame
  - Antériorité connue ou non au laboratoire
  - Cohorte non exhaustive



# Résultats

- **Nombre de patients inclus dans la première période d'étude : 156.**
- **Classement des patients en fonction des données complémentaires :**
  - Antécédents personnels et familiaux
  - Résultats biochimiques (ferritine, CRP, bilan martial, électrophorèse de l'hémoglobine)
- **4 groupes ont été créés :**

## **Groupe carence martiale**

Ferritinémie

55 patients (39 femmes et 16 hommes)

## **Groupe Inflammation**

CRP/Fibrinogène élevés

Histoire clinique compatible

9 patients (5 femmes et 4 hommes)

## **Groupe hémoglobinopathies**

Electrophorèse de l'hémoglobine

+/- Antécédents

53 patients (24 femmes et 29 hommes)

## **Groupe « Non-étiqueté »**

Données cliniques et/ou biologiques

insuffisantes, origine mixte

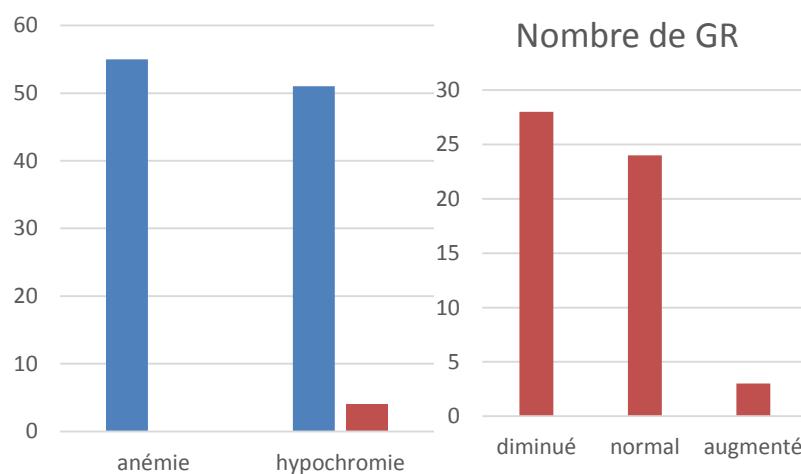
39 patients (23 femmes et 16 hommes)



# Résultats

## 1) Groupe carence martiale :

- **Hémogramme :**
  - VGM moyen = 66,6fL (55.4 – 74.5)
  - Hb : anémie dans 100% des cas
  - CCMH : hypochromie dans 93% des cas
  - Nombre de GR : diminué dans 51% des cas, normal dans 44% et augmenté dans 5% des cas
- **Anomalies morphologiques :**
  - Les annulocytes sont en nombre significatif dans 45% des cas
  - Les autres anomalies sont absentes ou présentes en nombre non significatif





# Résultats

---

## 1) Groupe carence martiale :

- **Indices érythrocytaires :**
  - Prédictifs d'une carence martiale avec une sensibilité variable

<b>England and Fraser</b>	<b>98.2%</b>
Green and King	96.4%
RDW	90.9%
Mentzer	83.6%
Srivastava	83.6%

- **Canal « réticulocytes » :**
  - 100% des patients sont non régénératifs
  - 95% ont une Ret-He diminuée
  - 100% possèdent une GR-He diminuée
  - Moyenne de GR hypochromes est de 34.3%

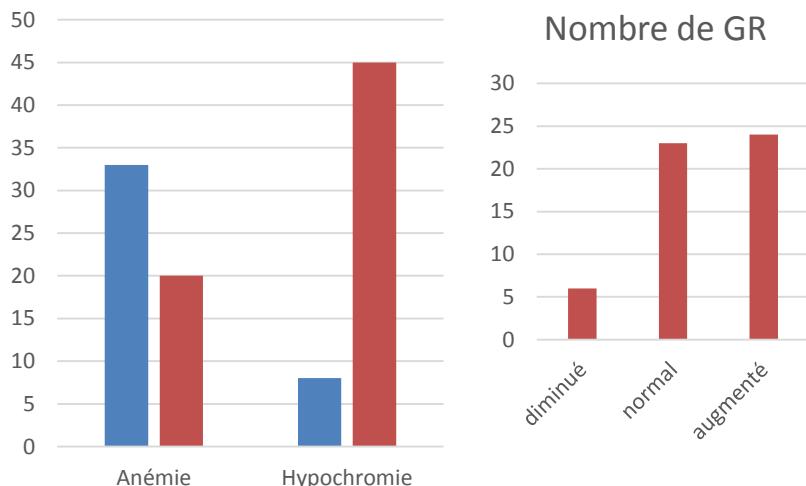


# Résultats

## 2) Groupe hémoglobinopathie:

### ■ Hémogramme :

- VGM moyen = 64.7fL (54.6 – 74.4)
- Hb : anémie dans 62% des cas
- CCMH : hypochromie dans 15% des cas
- Nombre de GR : augmenté dans 45% des cas, normal dans 43% et diminué dans 11% des cas



### ■ Anomalies morphologiques :

- Les annulocytes sont en nombre significatif dans 4% des cas
- Les hématies cibles sont en nombre très élevé (>20%) chez 30% des patients chez qui elles étaient attendues
- Les hématies pontuées sont présentes chez 19% des patients chez qui elles étaient attendues
- 7 sur 17 patients drépanocytaires présentent des drépanocytes
- Les autres anomalies sont absentes ou présentes en nombre non significatif



# Résultats

---

## 2) Groupe hémoglobinopathie:

- **Indices érythrocytaires :**
  - Peu prédictifs d'une hémoglobinopathie avec une sensibilité globalement faible

England and Fraser	58.5%
Green and King	63.5%
RDW	64.2%
Mentzer	56.6%
Srivastava	39.6%

- **Canal « réticulocytes » :**
  - 13% des patients sont régénératifs (drépanocytoses composites)
  - 92% ont une Ret-He diminuée
  - 98% possèdent une GR-He diminuée
  - Moyenne de GR hypochromes est de 14.8%



# Résultats

---

## 3) Groupe inflammation :

- Seulement 9 patients
- VGM moyen de 70,1fL
- 89% sont anémiés, 78% sont hypochromes
- Pas ou peu d'anomalies morphologiques observées
- Indices tous en faveur d'une carence martiale
- 100% des patients sont non régénératifs, ont une Ret-He diminuée et une GR-He diminuée. La moyenne de GR hypochromes est d'environ 18%

## 4) Groupe « non-étiqueté » :

Hémogramme	VGM = 67,2fL (50,4 – 74,6) 79% anémiés, 69% hypochromes
------------	--

Ce groupe est important, puisqu'il représente 25% de la cohorte. Malgré les conseils prodigués par les internes (prescription de ferritine ou d'une électrophorèse de l'hémoglobine), ces examens n'ont pas été réalisés.



## Confrontation des 2 principaux groupes

---

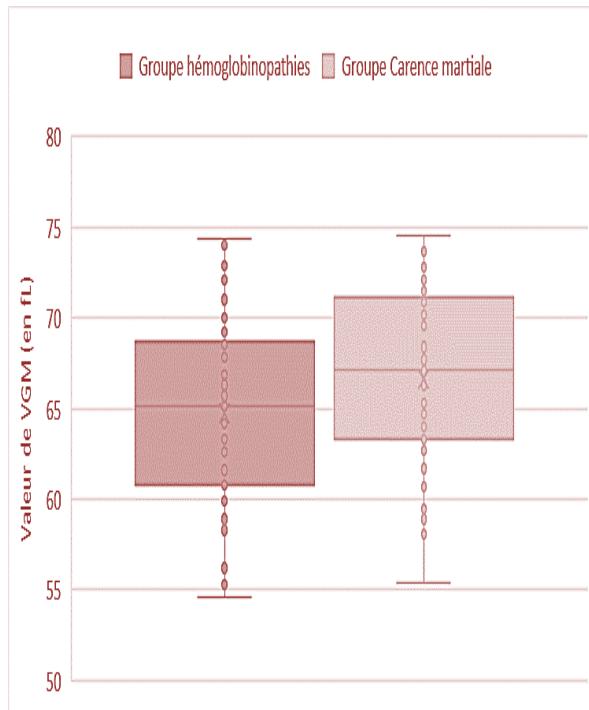
### 1. Concernant les paramètres de la numération globulaire de l'automate :

- Pas de différence significative entre les valeurs de VGM dans les 2 groupes ( $p = 0,024$ )
- L'hémoglobine a un taux significativement différent entre les 2 groupes ( $p < 0,0001$ ). Tous les patients du groupe carence martiale sont anémiés. Seulement 33 dans le groupe hémoglobinopathie
- La CCMH est significativement plus élevée dans le groupe hémoglobinopathie ( $p < 0,0001$ ). Elle est très rarement normale ( 4 patients) dans le groupe carence martiale
- Le nombre de GR est significativement plus élevé dans le groupe hémoglobinopathie ( $p < 0,0001$ ).

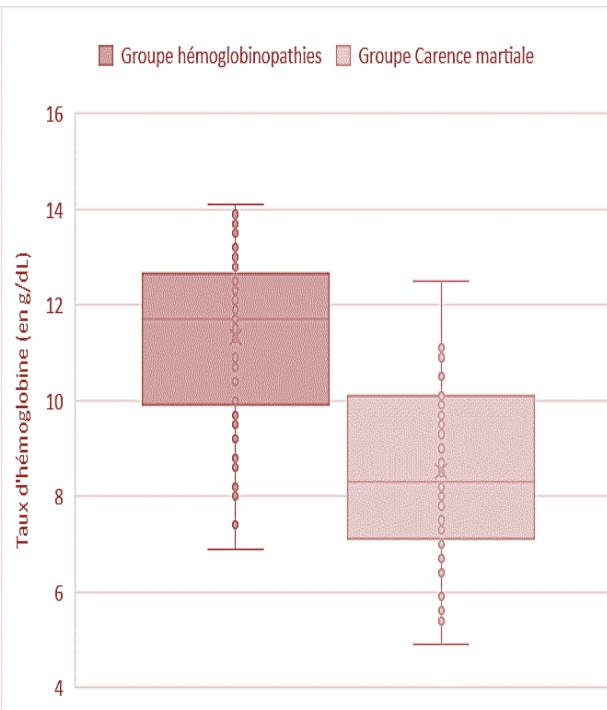


# Confrontation des 2 principaux groupes

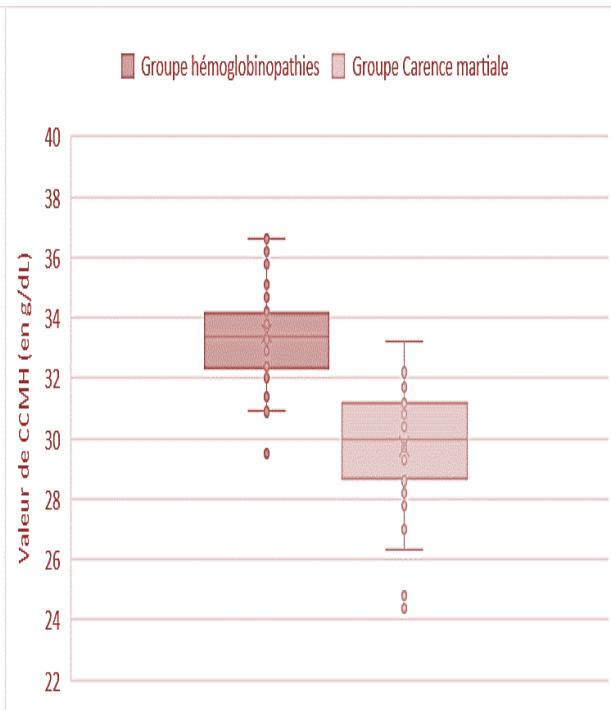
Valeur de VGM



Taux d'Hémoglobine



Valeur de CCMH





## Confrontation des 2 principaux groupes

### 2) Concernant les anomalies morphologiques :

	Présence d'annulocytes	Présence d'hématies ponctuées	Présence d'hématies cibles	Présence de drépanocytes
Groupe carence martiale	45%	0	0	0
Groupe hémoglobinopathie	4%	19%	30%	13%

- Dans le groupe hémoglobinopathie, les anomalies ne sont pas constantes mais, lorsqu'elles sont présentes, orientent vers une hémoglobinose et plus particulièrement un des types d'hémoglobinoses.



## Confrontation des 2 principaux groupes

---

### 3. Concernant les indices érythrocytaires :

- Les plus performants sont :
  - L'indice d'England and Fraser
  - L'indice de Green and King
- Ils sont performants quand ils orientent vers une hémoglobinopathie
- Un certain nombre de patients sont orientés à tort vers une carence martiale

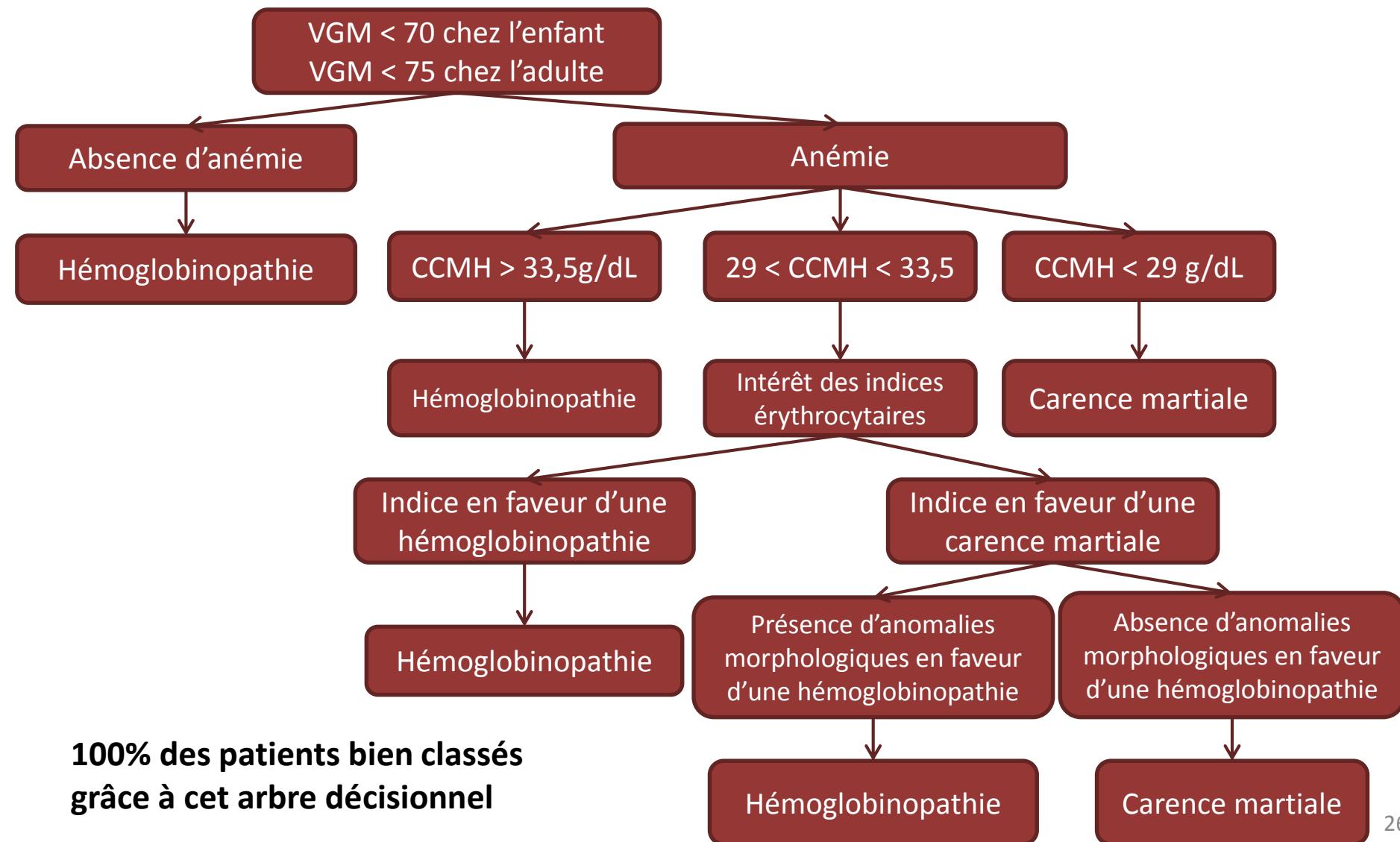
	England and Fraser	Green and King
Spécificité (en %)	98,5	96,4
Sensibilité (en %)	58,5	63,5

### 4) Concernant le canal « réticulocytes » :

- L'interprétation des nombres et indices rendus par l'automate est limitée



# Synthèse : un arbre décisionnel

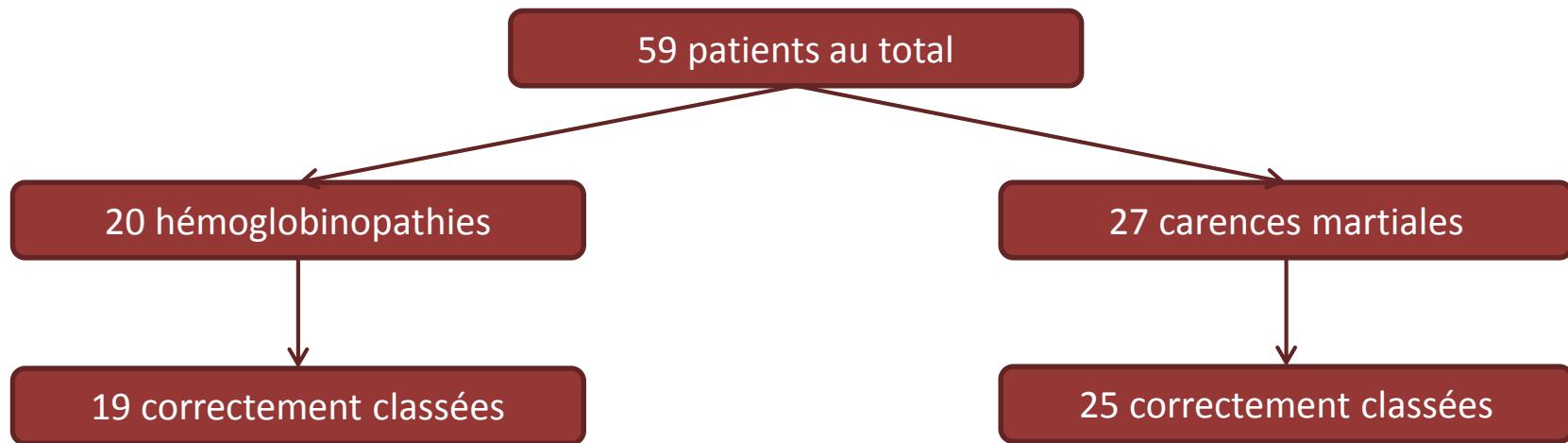




# Application de l'arbre décisionnel à la 2<sup>nde</sup> cohorte

- Cette cohorte comprenait 59 patients :

- 27 ayant une carence martiale
- 20 ayant une hémoglobinopathie
- 1 ayant un état inflammatoire
- 11 avec microcytose non déterminée



Soit 93,6% des patients dont l'orientation diagnostique est correcte



# Discussion

---

- **A propos de la cohorte rétrospective :**

- Concernant l'hémogramme :

- L'Hb et la CCMH sont des paramètres d'intérêt
    - Le nombre de GR est peu exploité : Hb/CCMH suffisent ou le calcul de l'indice érythrocytaire
    - Les autres paramètres ne sont pas concluants dans notre étude

- Les indices érythrocytaires (calculs mathématiques) :

- Performants s'ils orientent vers une hémoglobinopathie
    - Moins bons sur la carence : possiblement du fait que notre cohorte comporte tous types d'hémoglobinopathies microcytaires

- Sur la morphologie :

- Hématies cibles, Hématies ponctuées, drépanocytes orientent le diagnostic avec certitude
    - La présence d'annulocytes peut sans doute être exploitée : possible pour distinguer l'inflammation de la carence martiale ?
    - Les autres anomalies ne sont pas informatives

- Sur le canal « réticulocytes » :

- Peu d'intérêt : surcoût sans aide diagnostique



# Discussion

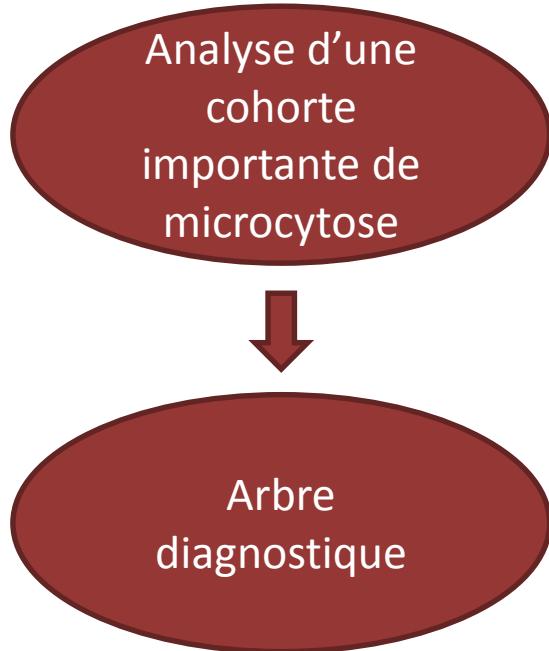
---

- **Sur la cohorte d'application :**

- Seulement 3 patients sur 47 mal classés :
  - Un patient avec une **polyglobulie de Vaquez** : cas où le patient peut être microcytaire sans pour autant être anémié.
  - Un patient carencé (ferritine à 9 $\mu$ g/L) sans anémie : « la carence n'existe pas sans anémie » est remise en cause.
  - Une **bêta-thalassémie** dans le groupe carence martiale : rare bêta-thalassémie sans anomalie morphologique érythrocytaire mise en évidence.



# Conclusion



- Cet arbre est validé sur la cohorte d'application
- Facilement applicable à la routine et à l'exercice de la biologie de ville

- Analyse de l'hémogramme
- Calcul d'un indice
- Analyse morphologique



# Remerciements

---

- Laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers  
Pr V. UGO  
Pr M. ZANDECKI  
Dr D. LUQUE PAZ
- Internes du semestre d'été 2013 pour ce travail
  - Mailys Le Guyader
  - Rachel Chenouard
  - Johann Rose
  - Damien Luque Paz
- Laboratoire d'hématologie CHU de Nantes
- Laboratoire du CHD de La Roche-sur-Yon
- L'ensemble des membres du Jury

