
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

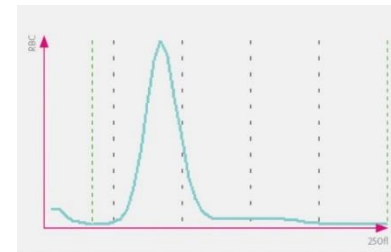
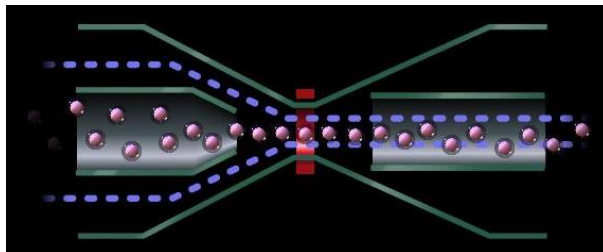
- Diminution du volume globulaire moyen (ou VGM) des globules rouges d'un individu.
- Le VGM est un paramètre érythrocytaire aidant à préciser l'étiologie d'une anémie.

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**

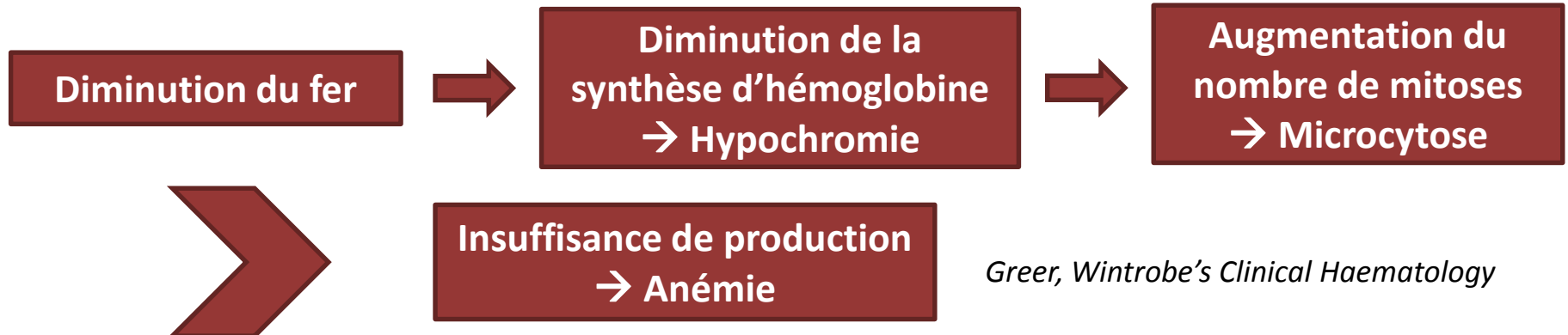
- La prévalence de la carence martiale dans le monde est de près de 25%.
- Différentes circonstances de découvertes : **fatigue**, **maux de tête**, perte de cheveux, grossesse, ménométrorragies, ulcères...

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



Greer, Wintrobe's Clinical Haematology



La carence martiale

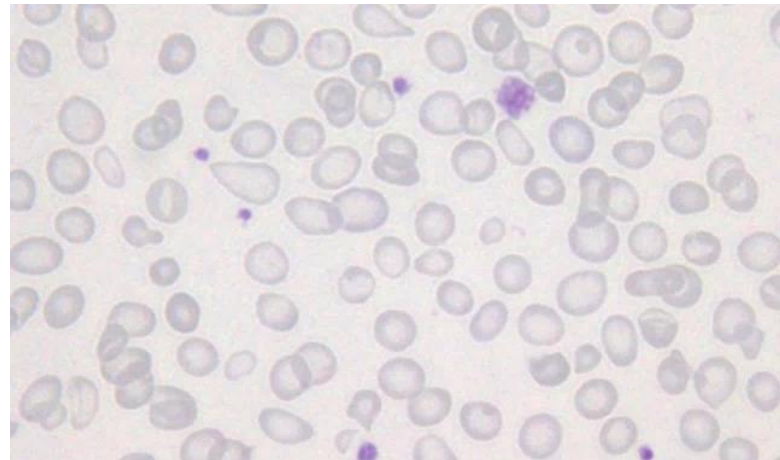
- **Diagnostic biologique**

- *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 **défait 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

- Déficit 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

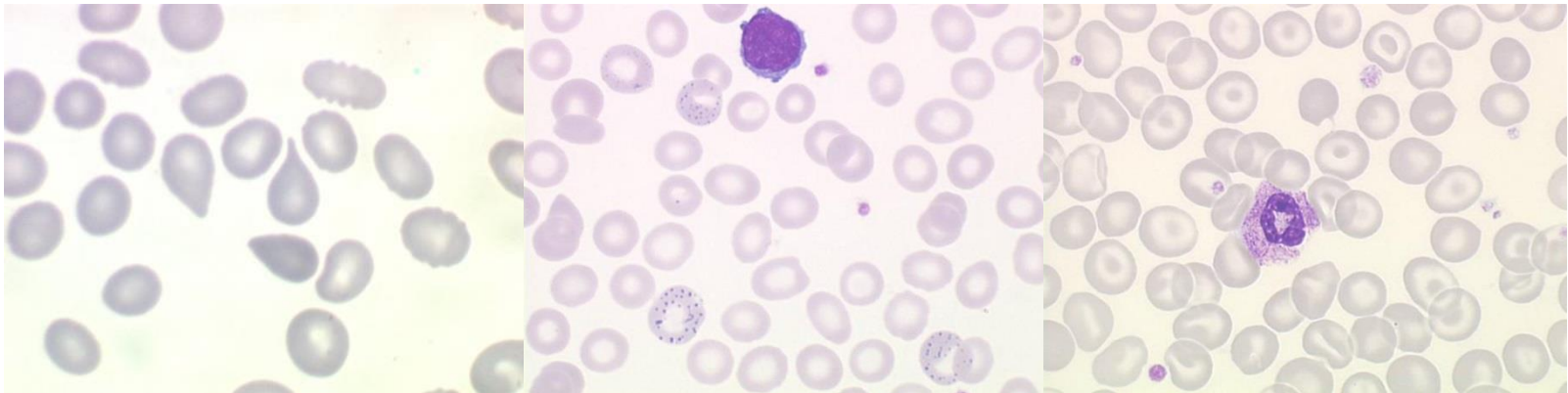
■ Diagnostic biologique

➤ Profil de l'hémogramme

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

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^{ème} méthode est nécessaire en cas d'anomalie qualitative



L'inflammation chronique

■ Définition

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

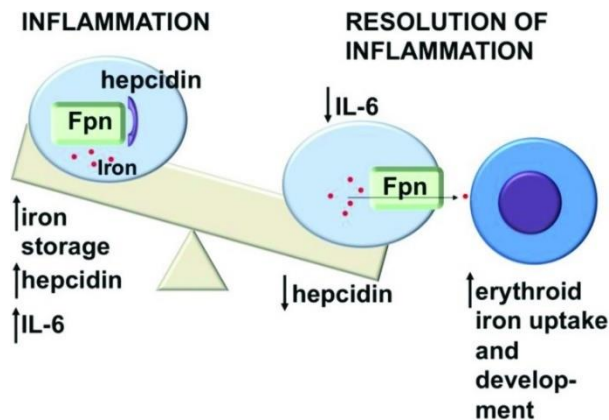
■ Epidémiologie

- **Cancers**
- **Infections chroniques**
- **Maladies auto-immunes**

Fraenkel et al, Med Clin North Am, 2017

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

■ Physiopathologie



Fraenkel et al, ASH, 2015

■ 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 :

Carences 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 :

Hoffmann et al., Clin Chem Lab Med, 2015

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



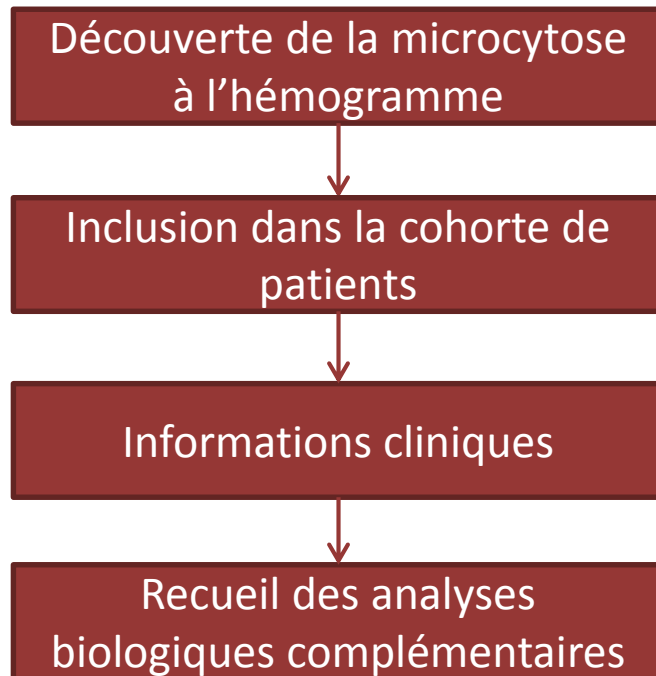
Objectif

- 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 antécédent 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^{ème} 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 hémoglobinopathies

Electrophorèse de l'hémoglobine

+/- Antécédents

53 patients (24 femmes et 29 hommes)

Groupe Inflammation

CRP/Fibrinogène élevés

Histoire clinique compatible

9 patients (5 femmes et 4 hommes)

Groupe « Non-étiqueté »

Données cliniques et/ou biologiques

insuffisantes, origine mixte

39 patients (23 femmes et 16 hommes)

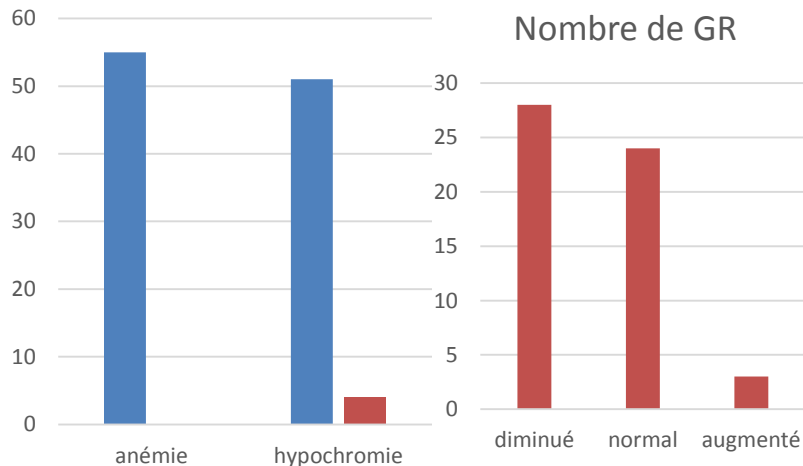


Résultats

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 :

- Prédicatifs d'une carence martiale avec une sensibilité variable

England and Fraser	98.2%
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%

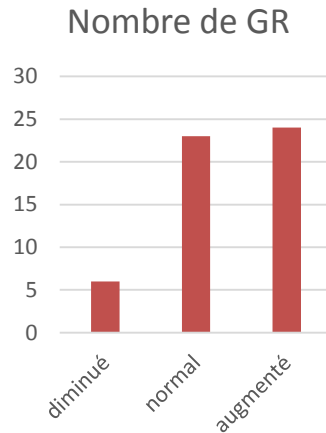
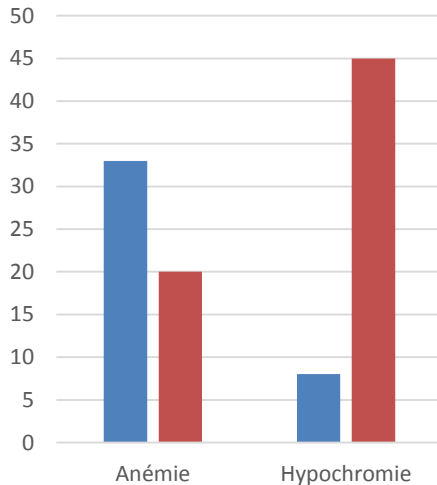


Résultats

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

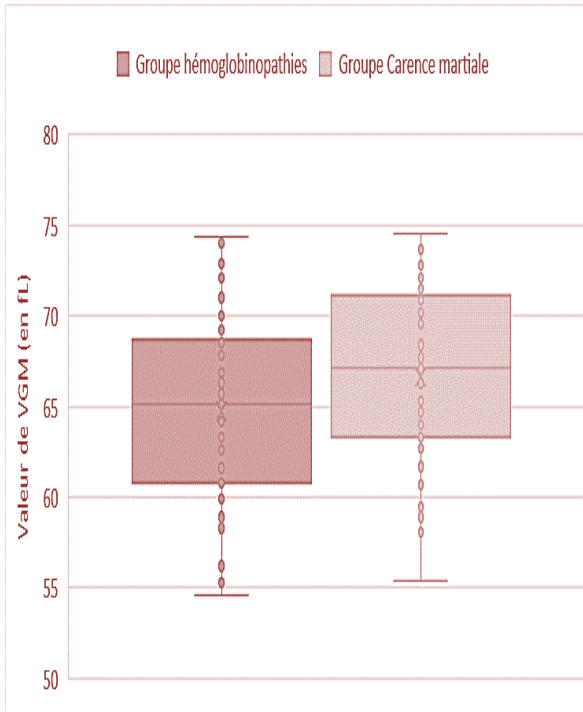
1. Concernant les paramètres de la numération globulaire de l'automate :

- 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 ($p < 0,0001$).



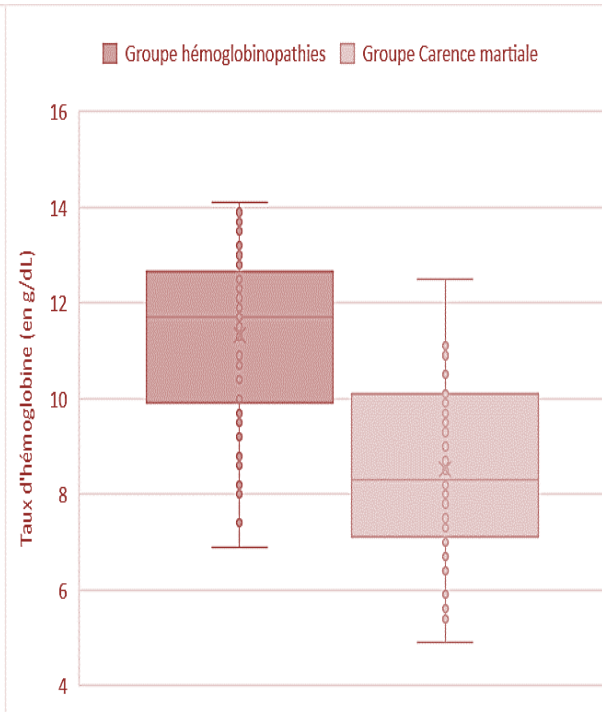
Confrontation des 2 principaux groupes

Valeur de VGM



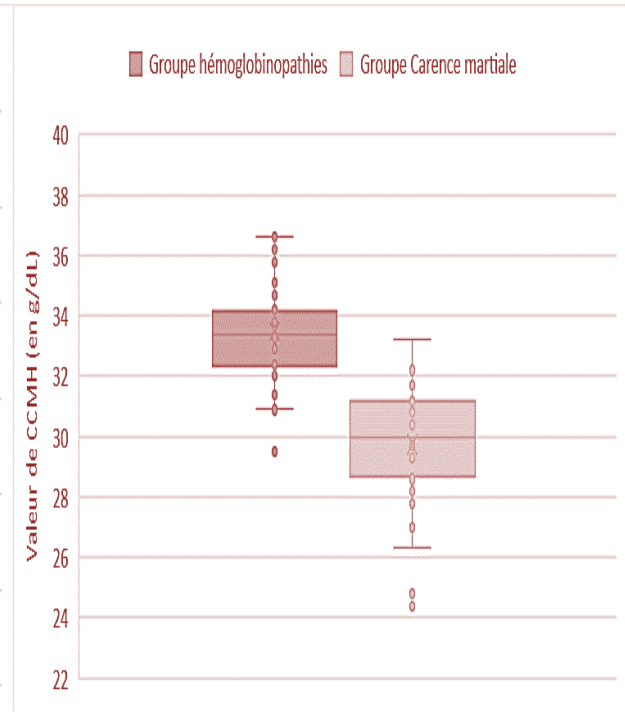
$p = 0,024$

Taux d'Hémoglobine



$p < 0,0001$

Valeur de CCMH



$p < 0,0001$



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

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

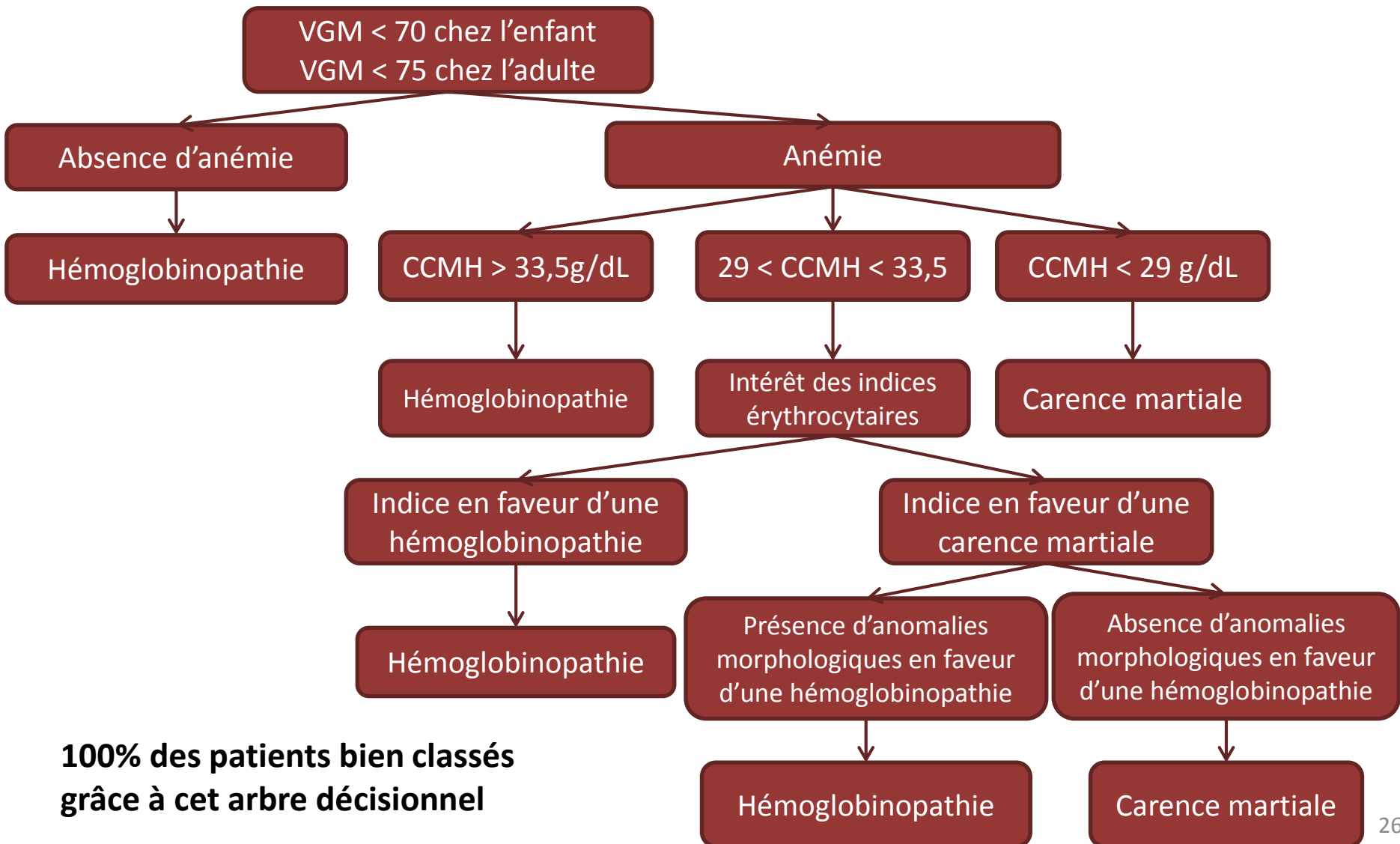
- Ils sont performants quand ils orientent vers une hémoglobinopathie
- Un certain nombre de patients sont orientés à tort vers une carence martiale

4) Concernant le canal « réticulocytes » :

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



Synthèse : un arbre décisionnel

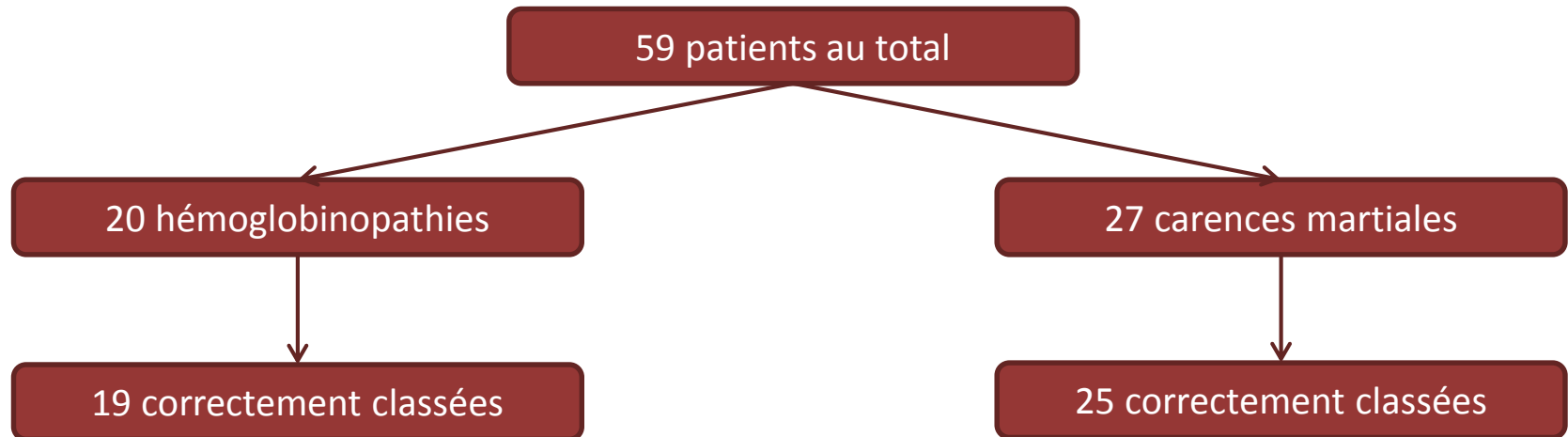




Application de l'arbre décisionnel à la 2nde cohorte

- 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

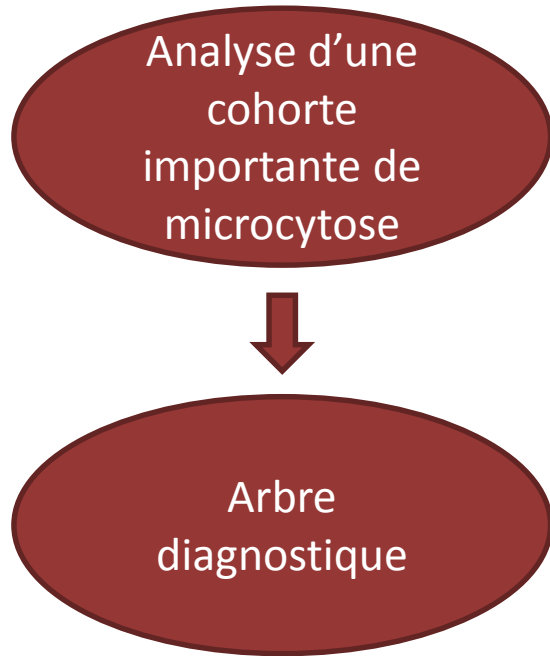
- **Sur la cohorte d'application :**

- 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 9µg/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

