sysmex | Lighting the way with diagnostics

WHITE PAPER HÉMATOLOGIE | Août 2022*

Pathologies érythrocytaires

Gestion des indices érythrocytaires anormaux dans le contexte des pathologies érythrocytaires

Introduction

Les pathologies érythrocytaires touchent aussi bien les enfants que les adultes et nécessitent une attention immédiate afin d'atténuer les symptômes. Ces pathologies peuvent être héréditaires, lorsque l'un ou les deux parents transmettent un gène défectueux à leur descendance, ou temporaires, lorsque les symptômes sont acquis au cours de la vie, mais dont l'avancement peut être atténué par un traitement approprié. Les pathologies érythrocytaires héréditaires sont dues à des défauts de l'hémoglobine ou de la membrane cellulaire, qui sont les deux principaux composants structurels d'un globule rouge, ou bien à des défauts enzymatiques dans le métabolisme érythrocytaire. Les progrès réalisés par les analyseurs d'hématologie ont permis de repérer de telles pathologies grâce à l'interprétation des paramètres avancés de la Numération Formule Sanguine (NFS) et à des algorithmes pertinents.

Hémoglobinopathies

Introduction sur l'hémoglobine

Un globule rouge est principalement composé d'hémoglobine et d'eau, ce qui place les molécules d'hémoglobine au centre de l'intérêt. Une molécule d'hémoglobine est toujours composée de quatre chaînes de globine, chacune d'entre elles comprenant le groupe hème, une porphyrine cyclique avec Fe^{2+} coordonné qui fixe et transporte l'oxygène (voir figure 1). Il existe une variété de chaînes de globines et différents types de molécules d'hémoglobine dont la composition des chaînes de globine varie. Le type d'hémoglobine le plus courant chez les adultes en bonne santé est l'HbA_0 (qui représente 97,5 % du total des molécules), constituée de deux chaînes d'α-globine et de deux chaînes de β-globine ($\alpha_2\beta_2$). Les 2,5 % restants sont constitués d'HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$), tandis que l'HbF, l'hémoglobine fœtale ($\alpha_2\gamma_2$), est la principale molécule durant la gestation [1].

Qu'est-ce qui caractérise les hémoglobinopathies ?

Les hémoglobinopathies constituent un vaste groupe de maladies génétiques, décrivant des perturbations quantitatives ou qualitatives de la production des chaînes de globine de l'hémoglobine (voir figure 1). Les perturbations qualitatives de la production d'hémoglobine peuvent générer des variants d'hémoglobine. À ce jour, plus de 1000 variants d'hémoglobine causés par des mutations de gènes spécifiques ont été identifiés [1]. La majorité d'entre eux sont sans conséquence clinique pour le porteur mais certains sont instables et peuvent entraîner une anémie hémolytique. Les porteurs d'hémoglobine instable sont rares et échappent souvent au diagnostic.

Les perturbations quantitatives de la synthèse de l'hémoglobine aboutissent souvent à des thalassémies. Ce vaste groupe de pathologies sanguines affecte la synthèse de la chaîne α ou β au plan génétique. La bêta-thalassémie est la forme la plus fréquente. Elle affecte exclusivement la chaîne β de l'hémoglobine, qui peut être réduite ou absente. Les trois formes principales de bêta-thalassémies sont la thalassémie majeure, la thalassémie intermédiaire et la thalassémie mineure [2].

* Révision de l'article original publié en novembre 2021

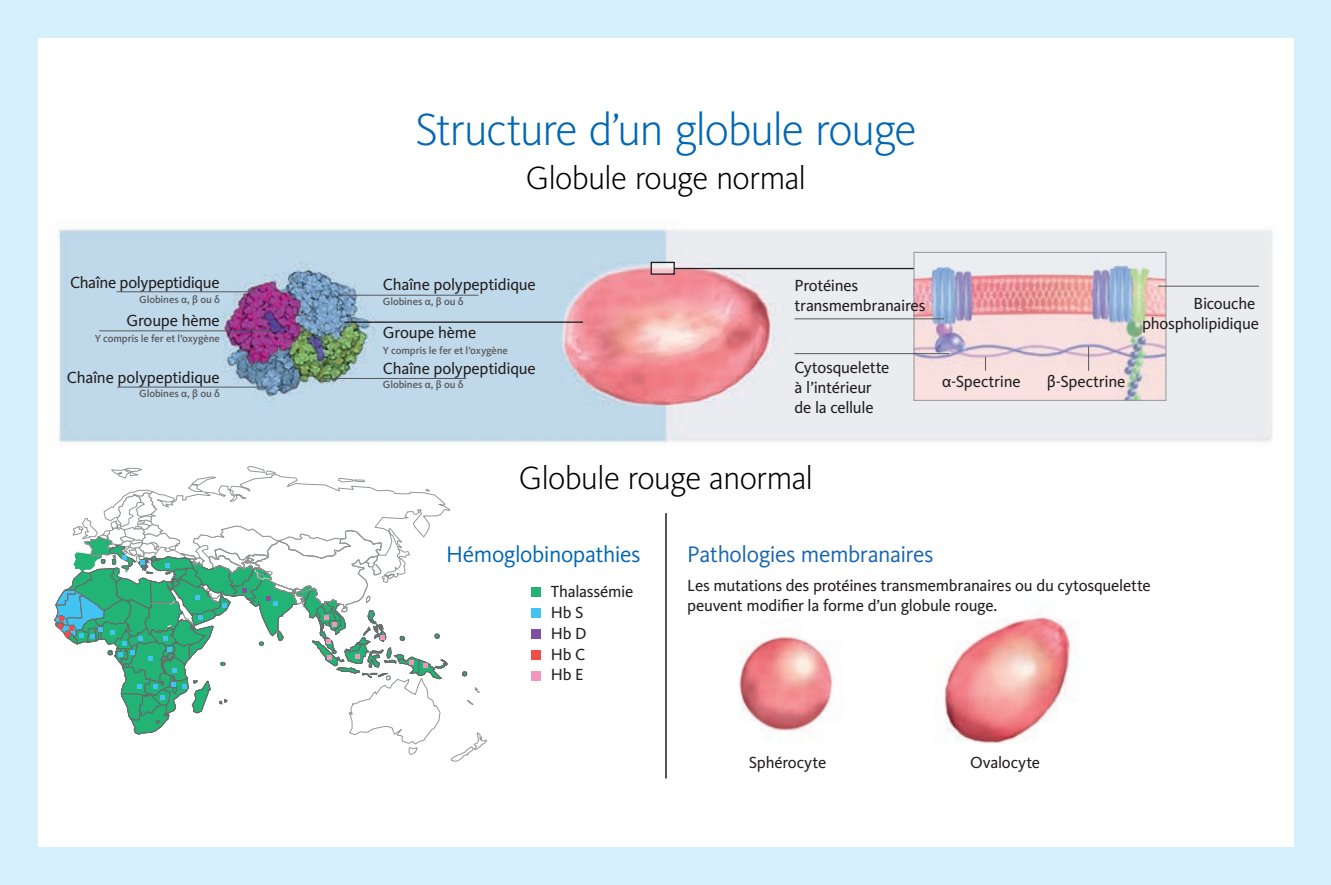


Fig. 1 Structure d'un globule rouge. *Un globule rouge sain acquiert sa forme distinctive (en haut au milieu) grâce à la composition unique de sa membrane (en haut à droite) et peut transporter de l'oxygène à l'aide de molécules d'hémoglobine (en haut à gauche). Les pathologies érythrocytaires peuvent provenir d'anomalies de l'hémoglobine (en bas à gauche) ou de la structure de la membrane cellulaire (en bas à droite).*

Suspicion de variants instables de l'hémoglobine

Plusieurs études de cas ont décrit l'apparition et le diagnostic consécutif de variants instables de l'hémoglobine à partir de sang périphérique, en utilisant les analyseurs d'hématologie automatisés Sysmex [3–7]. D'après ces études de cas, les variants instables de l'hémoglobine ne se comportent pas comme leurs homologues stables lors de la lyse des érythrocytes, étape importante dans la mesure des leucocytes.

Les échantillons présentant des variants d'hémoglobine instables ont montré une diminution du signal de fluorescence dans le canal de la formule leucocytaire (WDF), ce qui a déclenché une alarme, indiquant que la formule leucocytaire n'avait pas été effectuée correctement. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les variants instables d'hémoglobine libérés avaient interféré avec le marqueur de fluorescence utilisé pour la formule leucocytaire, donc avec la séparation des sous-populations [4, 5]. L'alarme déclenchée, associée aux nuages de points anormaux décrits et à une anémie hémolytique clinique, doit conduire à des analyses supplémentaires, telles qu'une analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) de la composition de l'hémoglobine et/ou un séquençage génétique.

Identification de la thalassémie

Il est possible de suspecter une thalassémie à partir de plusieurs analyses diagnostiques qui reposent sur différentes technologies. Les résultats d'une NFS constituent le premier point de contact avec un patient qui ignore sa thalassémie sous-jacente, puisque plusieurs paramètres sanguins s'avèrent efficaces pour identifier ces patients. Dans ce cas, il est crucial de distinguer les différentes causes d'anémie afin d'établir la stratégie thérapeutique la plus appropriée.

Danise *et al.* ont utilisé la numération des érythroblastes (NRBC) pour distinguer efficacement les thalassémies des autres pathologies érythrocytaires héréditaires. Dans une cohorte de patients atteints de thalassémie majeure, de thalassémie intermédiaire et de sphérocytose héréditaire, la présence de NRBC dans le sang périphérique s'est avérée être un indicateur manifeste de thalassémie. Elle a permis d'identifier correctement 100 % des cas de thalassémie majeure et 87 % des cas de thalassémie intermédiaire, tandis que les patients atteints de sphérocytose héréditaire ne présentaient pas de NRBC [8].

Un important effort de recherche a été consenti pour distinguer la bêta-thalassémie de l'anémie ferriprive (IDA), deux affections aux étiologies différentes mais qui ont en commun la présence de microcytes, ce qui complique leur différenciation. L'anémie ferriprive est une pathologie acquise dans laquelle il y a peu de fer disponible pour la synthèse de l'hémoglobine. Urrechaga *et al.* ont comparé les profils sanguins de porteurs de bêta-thalassémie et de patients IDA et ont ainsi identifié les différences entre les deux groupes. Les porteurs de bêta-thalassémie présentaient une augmentation du nombre d'érythrocytes, une diminution du volume globulaire moyen (VGM), un pourcentage élevé de microcytes (MicroR) et une augmentation modérée de la fraction réticulocytaire immature (IRF). En revanche, les patients atteints d'anémie ferriprive (IDA) avaient une présence renforcée de globules rouges à faible teneur en hémoglobine (Hypo-He) et une plus grande largeur de distribution des globules rouges (RDW-CV), paramètre qui indique une anisocytose [9].

Plusieurs groupes ont également développé des algorithmes basés sur les profils sanguins afin de différencier la bêta-thalassémie de l'anémie ferriprive, partant tous de la condition préalable commune de la présence de microcytes (VGM < 85 fL ou VGM < 80 fL). Schoorl *et al.*, par exemple, ont mis au point six algorithmes pour discriminer les deux pathologies, obtenant une sensibilité de 79 % pour la bêta-thalassémie et de 74 % pour l'anémie ferriprive [10]. Le white paper *« Paramètres érythrocytaires avancés dans le diagnostic différentiel et la prise en charge de l'anémie »* entre davantage dans les détails de ce second cas [11]. De plus, en utilisant une cohorte de 2664 patients atteints d'anémie microcytaire, Urrechaga *et al.* ont validé les performances de plus de 20 algorithmes discriminants différents. En fonction des besoins diagnostiques, certains algorithmes sont plus performants pour identifier ces pathologies ou les exclure [12]. Une classification plus poussée des bêta-thalassémies, parmi d'autres cas présentant des indices érythrocytaires anormaux, et pas exclusivement des anémies ferriprives, est discutée plus en détail dans le chapitre consacré au RBC Defect Workflow Optimisation (RWO).

Les analyseurs HPLC automatisés peuvent être intégrés dans le flux de travail du laboratoire et fournir des informations précieuses pour l'identification des thalassémies. C'est le cas de l'analyseur Tosoh HLC-723G11 qui est équipé d'un mode dédié à la bêta-thalassémie (beta-thal). En mode beta-thal, l'analyseur sépare et quantifie l'HbA_2 et l'HbF, toutes deux significativement élevées chez les patients atteints de bêta-thalassémie [13]. Les programmes de dépistage de la bêta-thalassémie sur le pourtour méditerranéen et au Moyen-Orient, où les thalassémies héréditaires constituent une problématique de santé publique, présentent également un intérêt particulier. L'objectif de ces programmes est d'identifier le statut de porteur d'hémoglobinopathies chez les couples fiancés afin de pousser à la consultation et de prévenir la propagation des thalassémies. Une étude réalisée dans la région du Kurdistan irakien a fait état de plus de 50 000 couples reçus en consultation, ce qui a permis d'en identifier 223 à haut risque. Ce programme de dépistage a permis de réduire le taux d'hémoglobinopathies majeures de 21,1 % [14].

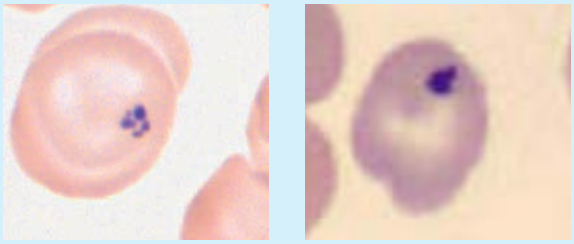
Outre la réduction des taux de frottis dans un laboratoire, l'examen attentif des alarmes provenant des analyseurs d'hématologie peut conduire à des indications inattendues de pathologies telles que les hémoglobinopathies ou les variants instables de l'hémoglobine, ce qui peut être très bénéfique pour le porteur concerné.

Inclusions érythrocytaires

Bien qu'elles ne constituent pas en soi une pathologie érythrocytaire, des inclusions érythrocytaires ont été décrites en association avec des anémies ou des thalassémies et pourraient servir d'indicateur supplémentaire pour ces pathologies. Les inclusions sont un phénomène courant et peuvent provenir de nombreuses sources différentes. Parmi elles, les corps de Pappenheimer et les corps de Howell-Jolly sont les plus importants. Les corps de Pappenheimer portent le nom du médecin qui les a découverts – Alwin M. Pappenheimer – et décrivent des corps d'inclusions érythrocytaires composés de fer sous forme de ferritine dans le cytosol [15]. Une stimulation de l'érythropoïèse (par exemple, provoquée par une anémie hémolytique) ou une altération de la production d'hémoglobine (par exemple, en cas de thalassémie) peut faire augmenter le nombre de globules rouges avec des corps de Pappenheimer [16]. Les corps de Howell-Jolly, quant à eux, sont des inclusions d'ADN. Ces inclusions érythrocytaires peuvent provenir d'une fragmentation pathologique du noyau de l'érythroblaste ou du matériel chromosomique subsistant après la mitose pendant l'érythropoïèse. Le contenu d'ADN restant dans la cellule peut interférer avec la numération des réticulocytes sur un analyseur d'hématologie et conduire à une pseudo-réticulocytose [17].

De plus, ces types d'inclusions sont présents chez les patients ayant subi une splénectomie, car la rate filtre généralement les globules rouges affectés et élimine les inclusions sans détruire les cellules – un processus appelé épépinage ou « pitting » [15]. D'autres inclusions telles que les corps de Heinz (agrégats d'hémoglobine dénaturée) ou les ponctuations basophiles (agrégats de ribosomes ou de fragments d'ARN ribosomal) peuvent également être retrouvées. Celles-ci peuvent impacter le nombre de réticulocytes, au même titre que d'autres pathologies de la membrane érythrocytaire.

Les inclusions susceptibles d'être colorées, telles que les corps de Howell-Jolly, interfèrent dans le canal des réticulocytes (RET) des analyseurs où les réticulocytes sont mesurés après marquage ADN/ARN par fluorescence. Les anomalies qui en résultent en terme d'alarmes, de scattergrammes et de numérations cellulaires alertent l'utilisateur pour qu'il procède à des examens complémentaires, tels qu'un examen microscopique ou par imagerie numérique automatique d'un frottis sanguin [17].



Corps de Pappenheimer à gauche. Source : Copyright Universitätsklinikum Aachen AÖR, Klinik für Hämatologie, Onkologie, Hämostaseologie und Stammzelltransplantationen, Medizinische Klinik IV, Uniklinikum RWTH Aachen. Corps de Howell-Jolly à droite. Source : Sheikh Khalifa Medical City, Hematology Section, Abu Dhabi, UAE

Pathologies de la membrane érythrocytaire

Physiologie de la membrane érythrocytaire

Les globules rouges matures circulant dans le sang périphérique ont la forme caractéristique d'un disque biconcave qui semble comprimé au milieu, avec une plus grande épaisseur à la périphérie (voir figure 1). Cette forme, ainsi que l'absence de noyau, permettent aux cellules de transporter davantage de molécules d'oxygène qu'une cellule de forme sphérique de même volume (ratio surface/volume plus élevé) et de se déformer lorsqu'elles passent dans des capillaires dont le diamètre est inférieur au leur (déformabilité) [18].

La membrane des globules rouges, comme celle de pratiquement toutes les cellules humaines, est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont intégrées des protéines transmembranaires qui facilitent l'échange d'ions et le libre mouvement des molécules d'eau. Un réseau spécifique aux globules rouges, constitué de protéines du cytosquelette, principalement des spectrines et des actines, est ancré dans des complexes protéiques qui incluent les protéines transmembranaires et forment un maillage qui tapisse la face cytoplasmique de la bicouche membranaire. Cette double structure composée de la bicouche lipidique avec ses protéines et du maillage confère aux érythrocytes leur forme, leur intégrité et leurs propriétés de déformabilité pour leur permettre de circuler et de survivre pendant 120 jours dans le sang périphérique (voir Figure 1) [19].

Qu'est-ce qui caractérise les pathologies de la membrane érythrocytaire ?

Toute anomalie des protéines transmembranaires ou du cytosquelette modifie la forme biconcave du disque, ce qui altère les propriétés physiologiques des cellules et entraîne une réduction de la motilité et de la demi-vie. Plusieurs de ces pathologies érythrocytaires membranaires ont fait l'objet de recherches approfondies au cours des dernières décennies, car il était nécessaire de disposer d'analyses de détection plus rapides et plus faciles à utiliser.

La sphérocytose héréditaire est une pathologie héréditaire de la membrane des globules rouges caractérisée par la présence de globules rouges sphériques qui ont perdu leur concavité centrale (voir figure 1). La pathologie est la conséquence de défauts affectant les protéines membranaires, qui conduisent au décollement du maillage de la bicouche lipidique, altérant complètement la physiologie des cellules. Les sphérocytes perdent leur déformabilité et se retrouvent piégés lors de la filtration du sang dans la rate. L'activité plus intense de la rate destinée à éliminer les sphérocytes entraîne une augmentation du volume de l'organe (splénomégalie), l'un des traits cliniques caractéristiques de la maladie, ainsi qu'un ictère et une anémie à des degrés divers. Certains sphérocytes s'échappent cependant et réintègrent la circulation, où ils peuvent être identifiés par des analyses de laboratoire [20].

La destruction des globules rouges dans la rate est compensée par une production et une libération plus importantes de réticulocytes par la moelle osseuse. Les réticulocytes des patients atteints de sphérocytose héréditaire ont presque entièrement perdu leur matériel génétique et seules quelques cellules dont le contenu génétique est plus important peuvent être retrouvées. Cela permet de différencier la sphérocytose héréditaire d'autres pathologies, comme les troubles hémolytiques et la carence martiale, où l'on retrouve un nombre plus élevé de réticulocytes immatures.

Semblable à la sphérocytose héréditaire, l'ovalocytose du sud-est asiatique est une pathologie héréditaire de la membrane des globules rouges, résultant d'une mutation de la bande 3 de la protéine transmembranaire qui entraîne une dérégulation de l'échange ionique, ainsi que des anomalies structurelles. Les globules rouges acquièrent une forme ovale distinctive qui affecte leur déformabilité (voir figure 1), mais les sujets atteints ne présentent généralement pas de symptômes cliniques graves, hormis des signes légers d'hémolyse et un ictère [21].

Les syndromes drépanocytaires sont d'autres pathologies majeures qui nécessitent de disposer d'un test diagnostique plus rapide. Bien qu'elle soit causée par la mutation d'un gène de la chaîne β-globine de l'hémoglobine A, qui entraîne la production de l'hémoglobine HbS, la drépanocytose est associée à d'autres troubles de la membrane érythrocytaire en raison de la forme caractéristique en faucille que les globules rouges acquièrent dans des conditions de faible teneur en oxygène (voir figure 1). Cette forme en faucille peut provoquer des épisodes ischémiques car les globules rouges bloquent la circulation sanguine dans les capillaires. Un autre facteur important dans la physiopathologie de la maladie est la durée de vie très courte d'un globule rouge falciforme (20 jours max.) qui contribue à un taux d'hémolyse que la moelle osseuse est incapable de compenser [22].

Algorithme pour la sphérocytose héréditaire

Avec les progrès technologiques réalisés par les analyseurs d'hématologie et la possibilité de mesurer les réticulocytes et leurs différentes fractions, la réticulocytose est désormais considérée comme une caractéristique clinique et diagnostique supplémentaire de la pathologie. Les premiers chercheurs à exploiter ces caractéristiques ont été Mullier *et al.* avec leur outil diagnostique pour le dépistage de la sphérocytose héréditaire basé sur les résultats de l'hémogramme. Dans leur cohorte, les 45 patients dont la pathologie a été confirmée présentaient une numération réticulocytaire (RET) ≥ 80.000/µL et un ratio entre les réticulocytes et la fraction réticulocytaire immature (RET/IRF) supérieur à 7,7. Ces valeurs ont servi de condition préalable au dépistage des cas de sphérocytose héréditaire avec une sensibilité de 100 % dans la différenciation des troubles hémolytiques, des carences martiales, des contrôles sains et d'autres échantillons de routine. Les traits caractéristiques ou légers étaient caractérisés par un taux d'hémoglobine (HGB) supérieur à 12,0 g/dL (7,4 mmol/L) et RET/IRF ≥ 19.

La gravité de la pathologie a été évaluée à l'aide de paramètres cliniques avancés dérivés de l'hémogramme. Les cas plus graves sont caractérisés par la libération de microparticules, des fragments membranaires qui se sont détachés du globule rouge en raison du décollement du maillage, ce qui se traduit par une augmentation du paramètre MicroR. De plus, la faible teneur en hémoglobine des globules rouges peut être évaluée à l'aide du paramètre Hypo-H*e*. Ces deux paramètres combinés ont permis d'identifier les cas modérés ou sévères : patients présentant un MicroR ≥ 3,5 %, et un MicroR/Hypo-H*e* ≥ 2,5 (avec HGB entre 8,0 et 12,0 g/dL, 5,0 et 7,4 mmol/L) ou un MicroR/Hypo-H*e* ≥ 2,0 (avec HGB < 8,0 g/dL, 5,0 mmol/L) [23].

Cet algorithme d'identification de la sphérocytose héréditaire, utilisant uniquement les résultats de la NFS d'un analyseur d'hématologie Sysmex, a été intégré dans les directives pour le diagnostic en laboratoire des pathologies érythrocytaires membranaires publiées par *l'International Council for Standardization in Haematology* (ICSH) en 2015. Ces directives reconnaissent l'efficacité de l'algorithme et précisent qu'un résultat positif doit être complété par une analyse de confirmation pour les cas où il n'y a pas d'antécédents familiaux de sphérocytose héréditaire documentés [24].

Après la publication de Mullier *et al.*, plusieurs autres groupes ont validé l'algorithme et ajusté les seuils pour qu'ils reflètent mieux chacune des cohortes de patients. Persijn *et al.*, travaillant dans un hôpital universitaire, se sont occupés de pathologies plus sévères et de patients splénectomisés. La splénectomie, intervention chirurgicale courante chez les patients atteints de sphérocytose héréditaire, a permis de réduire le taux de réticulocytes dans le sang périphérique. La compensation par la moelle osseuse n'est plus nécessaire, car les taux de globules rouges et d'hémoglobine reviennent à des niveaux physiologiques.

Puisque l'objectif était d'identifier uniquement des patients inconnus, le groupe a été en mesure d'augmenter le seuil initial de RET à 100.000/µL et de diminuer le seuil de MicroR pour les cas graves à 2,6 %. Ces seuils ont permis d'atteindre une sensibilité de 100 % [25].

De même, Sottiaux *et al.* ont confirmé que l'algorithme n'est pas adapté aux patients splénectomisés, bien qu'ils aient conservé le seuil RET initial proposé par Mullier *et al.* et abaissé à 14 le seuil RET/IRF pour les traits caractéristiques et les cas légers, obtenant ainsi une sensibilité de 94 % [26]. Enfin, en utilisant les mêmes paramètres sanguins, Bobée *et al.* ont pu identifier tous les cas de sphérocytose héréditaire, ainsi que tous les patients présentant un déficit en pyruvate-kinase, un déficit enzymatique des globules rouges. Les critères suivants ont été retenus pour la sphérocytose héréditaire : RET ≥ 80.000/µL, RET/IRF > 9,1 et MicroR > 2,2 % avec HGB < 12,0 g/dL (7,4 mmol/L) ou MicroR/Hypo-He ≥ 3,5 avec HGB > 12,0 g/dL (7,4 mmol/L). De même, pour le déficit en pyruvate-kinase : RET > 150.000/µL, RET/IRF > 9,5, MicroR < 5,5 % et MicroR/Hypo-He < 6,0 [27]. Les seuils retenus pour les paramètres inclus dans l'algorithme sont synthétisés dans le tableau 1.

Tableau 1 *Aperçu des valeurs retenues comme seuils pour le dépistage et l'identification de la sphérocytose héréditaire.*

	Mullier *et al.*	Persijn *et al.*	Sottiaux *et al.*	Bobeé *et al.*
Patients SH				
■ nombre	n = 45	n = 20	n = 27	n = 47
Condition préalable				
■ RET#	≥ 80 000/µL	≥ 100 000/µL	≥ 80 000/µL	≥ 80 000/µL
■ RET/IRF	> 7,7	> 7,7	> 7,7	> 9,1
Sévérité				
Légère et caractéristique				
■ RET/IRF	≥ 19	≥ 19	≥ 14	> 9,1
Modérée et sévère				
■ MicroR	≥ 3,5 %	≥ 2,6 %	≥ 3,5 %	> 2,2 % avec HGB < 12,0 g/dL avec HGB < 7,4 mmol/L
■ MicroR/Hypo-He (8,0 g/dL < HGB < 12,0 g/dL) (5,0 mmol/L < HGB < 7,4 mmol/L)	≥ 2,5	≥ 2,5	≥ 2,5	≥ 3,5 avec HGB > 12,0 g/dL avec HGB > 7,4 mmol/L
■ MicroR/Hypo-He (HGB < 8,0 g/dL) (HGB < 5,0 mmol/L)	≥ 2,0	≥ 2,0	≥ 2,0	
Performances				
■ Sensibilité	100 %	100 %	94,1 %	100 %
■ Spécificité	99,3 %	99 % (sans splénectomie)	96,7 %	92,1 %

Arbre décisionnel pour les indices érythrocytaires erronés

Bien que l'identification ciblée de la sphérocytose héréditaire par rapport à d'autres pathologies hémolytiques améliore l'efficacité du diagnostic et du flux de travail, elle ne reflète pas entièrement les besoins des cliniciens et la charge de travail quotidienne des laboratoires. Berda-Haddad *et al.* se sont rendu compte qu'il était possible de suspecter des cas de pathologies érythrocytaires, principalement les syndromes drépanocytaires et la sphérocytose héréditaire, à partir d'une concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) élevée (> 36,5 g/dL, 22,7 mmol/L). Ils ont donc développé un arbre décisionnel pour différencier ces pathologies des autres étiologies aux indices érythrocytaires erronés.

La CCMH est considérée comme un indice érythrocytaire stable avec une marge très étroite. Chaque fois qu'une numération élevée apparaît, il est important que le médecin traitant comprenne si ce phénomène est un artefact ou s'il reflète réellement un état pathologique (voir encadré pour plus d'informations). Pour résoudre ce problème, Berda-Haddad *et al.* ont comparé les paramètres érythrocytaires et l'HGB entre les technologies standard et l'analyse par fluorocytométrie en flux proposée par les analyseurs d'hématologie automatisés Sysmex. En s'appuyant sur les éléments biologiques de la pathologie et sur une inspection visuelle de l'échantillon sanguin, ils ont créé un arbre décisionnel permettant d'identifier les cas d'agglutinines froides, d'interférences optiques et de pathologies érythrocytaires.

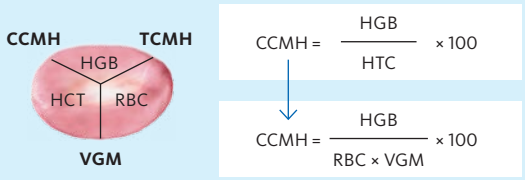
L'agglutination à froid des érythrocytes a pu être détectée à partir d'une différence entre la mesure optique et la méthode de détection des érythrocytes par courant continu (DC) à focalisation hydrodynamique. Puisque la méthode optique ne présentait aucune interférence, c'est elle qui a été rapportée.

Les cas d'interférences optiques et de pathologies érythrocytaires ont montré les mêmes différences au niveau de l'hémoglobine entre les deux technologies. Une distinction entre les deux a été possible grâce au RBC score, calculé à partir de la numération des réticulocytes et de la numération des globules rouges fragmentés (FRC), qui sont les deux paramètres qui augmentent dans les échantillons présentant des pathologies érythrocytaires connues.

Les cas de syndromes drépanocytaires et de sphérocytose héréditaire présentaient un RBC score positif et reflétaient une augmentation réelle de la CCMH. L'arbre décisionnel décrit figure dans l'unité *Extended* Information Processing Unit (IPU) de Sysmex en tant qu'application CBC-O (voir encadré pour plus d'informations) [28].

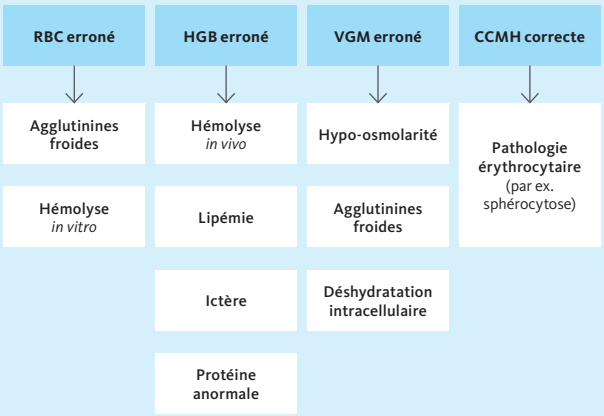
CCMH augmentée et application CBC-O

La CCMH est calculée à partir du ratio entre l'HGB et l'HCT, qui est lui-même calculé à partir de la numération des globules rouges et du VGM.



L'application CBC-O compare les indices érythrocytaires générés par les méthodes de détection DC à focalisation hydrodynamique et le dosage de l'hémoglobine au laurylsulfate de sodium (SLS) à ceux des canaux optiques, ce qui, avec une inspection visuelle de l'échantillon, suggère la cause la plus probable de l'augmentation de la CCMH et propose les valeurs qu'il convient de rapporter.

Des erreurs pré-analytiques et analytiques des échantillons peuvent conduire à des valeurs erronées de GR, HGB ou VGM, à l'origine de valeurs de CCMH faussement élevées. Les agglutinines froides en sont un exemple typique. Une augmentation réelle de la CCMH est caractéristique des pathologies érythrocytaires telles que la sphérocytose héréditaire.



RBC Defect Workflow Optimisation (RWO)

Les études décrites dans les chapitres précédents montrent le grand intérêt et la nécessité d'un diagnostic fiable des hémoglobinopathies et des pathologies érythrocytaires membranaires pour les distinguer des autres causes d'anomalies des indices érythrocytaires. Dans une série de deux études, Nivaggioni *et al.* ont pu fournir une approche holistique et ont décrit un algorithme fiable qui a permis de distinguer plusieurs pathologies érythrocytaires héréditaires (notamment les hémoglobinopathies hétérozygotes, les syndromes drépanocytaires, la sphérocytose héréditaire et l'ovalocytose du sud-est asiatique) et de les différencier de patients atteints d'anémie ferriprive (pathologie acquise) ou d'autres pathologies. L'indication de chaque pathologie était accompagnée des analyses de suivi recommandées, capables de confirmer le diagnostic, ce qui permet d'éviter des analyses inutiles susceptibles de générer des résultats erronés et, en définitive, de réduire la charge de travail des laboratoires de diagnostic.

L'algorithme a évalué la présence de plusieurs paramètres érythrocytaires et réticulocytaires avancés, à savoir MicroR, NRBC, RDW-SD, CCMH et le ratio Hypo-He/MicroR. Les échantillons présentant des valeurs de CCMH normales (≤ 36,5 g/dL, 22,7 mmol/L) ont été intégrés dans l'algorithme dès le début, tandis que les échantillons présentant une CCMH réellement augmentée (> 36,5 g/dL, 22,7 mmol/L), telle qu'identifiée par l'application CBC-O décrite dans le chapitre précédent, ont directement été intégrés dans la partie inférieure de l'algorithme (voir la figure 2).

Les hémoglobinopathies hétérozygotes et l'anémie ferriprive se présentaient comme des cas avec des valeurs normales de CCMH (< 36,5 g/dL, 22,7 mmol/L) et des microcytes (MicroR > 12,9 %).

Une distinction entre les deux a été rendue possible par le fait que les patients atteints d'hémoglobinopathies avaient un RDW-SD faible (< 38,5 fL). Les cas de syndromes drépanocytaires présentaient une CCMH normale ou élevée. Dans le premier cas, les taux de microcytes étaient variables mais se distinguaient des autres pathologies ou de l'anémie ferriprive par la fréquence plus élevée de NRBC (> 0,9 %) avec une CCMH > 33,8 g/dL (21,0 mmol/L) ou un RDW-SD plus élevé (> 38,5 fL) avec une CCMH > 33,0 g/dL (20,5 mmol/L). Ces cas ont ensuite été transmis à la partie inférieure de l'algorithme, où ils ont été évalués avec les échantillons dérivés de l'application CBC-O.

La sphérocytose héréditaire, l'ovalocytose du sud-est asiatique et une partie des cas de syndromes drépanocytaires ont été identifiés par l'application CBC-O comme de véritables cas de CCMH augmentée. Avec les autres cas de syndromes drépanocytaires figurant dans la partie supérieure de l'algorithme, ils ont été évalués initialement par le RBC score. Les cas de syndromes drépanocytaires et de sphérocytose héréditaire présentaient un RBC score positif, en raison du nombre élevé de réticulocytes, et reflétaient une véritable augmentation de la CCMH. L'ovalocytose du sud-est asiatique, au contraire, ne s'est pas manifestée par une libération accrue de réticulocytes dans le sang périphérique, de sorte que le RBC score est resté très faible (< 0,15). Il a été possible de distinguer ces deux pathologies dont le RBC score était positif en s'appuyant sur le fait que les cas de syndromes drépanocytaires avaient un IRF supérieur à 20 %. Les cas d'ovalocytose du sud-est asiatique ont été confirmés par un ratio Hypo-He/MicroR supérieur à 1,5 (voir la figure 2 et le tableau 2) [29, 30].

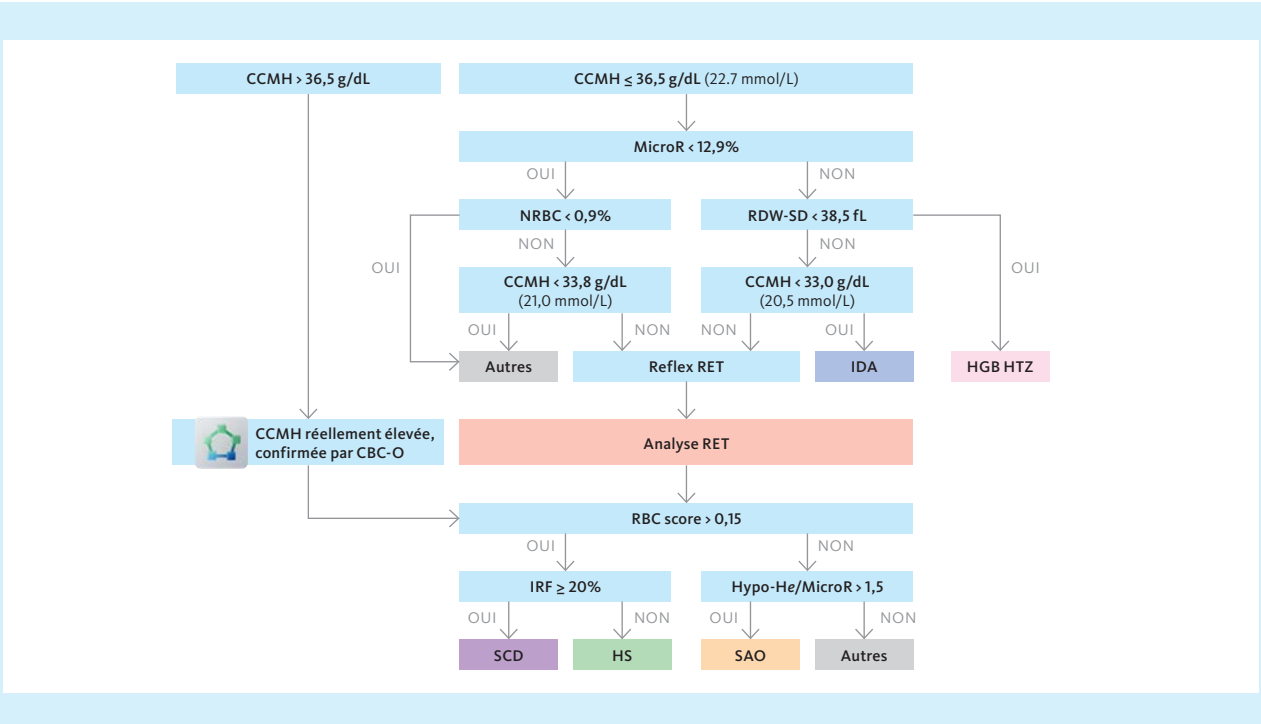


Fig. 2 RBC Defect Workflow Optimisation (RWO). *Algorithme identifiant les cas d'hémoglobinopathies hétérozygotes (HGB HTZ), d'anémie ferriprive (IDA), de syndromes drépanocytaires (SCD), la sphérocytose héréditaire (HS) et l'ovalocytose du Sud-Est Asiatique (SAO) sur la base des résultats de l'application CBC-O ainsi que des paramètres érythrocytaires et réticulocytaires avancés. Adapté de Nivaggioni V et al. 2021 [30].*

Tableau 2 *Indices érythrocytaires et RBC score à partir d'échantillons de pathologies érythrocytaires. Présente la moyenne avec un intervalle de confiance à 95 %. Les valeurs surlignées indiquent les données utilisées dans l'algorithme [30].*

	Syndromes drépanocytaires	Sphérocytose	Ovalocytose	Autres
Patients	n = 24	n = 14	n = 18	n = 68
CCMH (g/dL)	36,9 [36,6 – 37,6]	37,4 [36,6 – 38,3]	37,4 [36,7 – 38,2]	37,0 [36,6 – 38,7]
RBC Score	0,918 [0,15 – 1,00]	0,560 [0,01 – 1,00]	0,004 [0,00 – 0,06]	0,013 [0,00 – 1,00]
IRF (%)	30,0 [10,0 – 42,8]	9,7 [6,1 – 16,0]	14,4 [6,0 – 36,8]	10,8 [0,0 – 49,6]
Hypo-He/ MicroR	0,46 [0,11 – 1,33]	0,07 [0,00 – 0,32]	6,72 [2,78 – 11,87]	0,10 [0,00 – 0,86]
Hypo-He (%)	1,7 [0,2 – 10,5]	0,3 [0,1 – 2,5]	20,5 [9,5 – 38,7]	0,2 [0,0 – 4,6]
MicroR (%)	5,5 [0,3 – 19,9]	3,3 [1,7 – 17,2]	2,8 [1,5 – 10,1]	2,5 [0,5 – 23,0]

Conclusion

Bien que les analyseurs d'hématologie ne soient pas en mesure de déterminer directement les anomalies morphologiques, la biologie des pathologies érythrocytaires se reflète dans les indices érythrocytaires et dans les paramètres érythrocytaires avancés.

L'interprétation pertinente de la numération sanguine et des algorithmes tirant parti des caractéristiques de la pathologie constitue une solution rapide et sensible pour identifier certaines pathologies érythrocytaires, avec la capacité de les distinguer d'autres étiologies entraînant des indices érythrocytaires anormaux. Cela permet d'établir un diagnostic en temps utile et de prendre une décision thérapeutique appropriée pour chaque patient, tout en réduisant la charge de travail du laboratoire, grâce à la suppression des frottis sanguins et des examens cytologiques inutiles.

Références

[1] ***Thom CS et al. (2013):*** *Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. Cold Spring Harb Perspect Med 3(3): a011858.*

[2] ***Kohne E. (2011):*** *Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. Dtsch Arztebl Int 108(31-32): 532–40.*

[3] ***Rosetti M et al. (2015):*** *A rare case of Hemoglobin Leiden interfering with the DIFF channel of Sysmex XE-2100. Scand J Clin Lab Invest 75(5): 436–7.*

[4] ***Jongbloed W et al. (2018):*** *Unstable haemoglobin variant Hb Leiden is detected on Sysmex XN-Series analysers. Clin Chem Lab Med 56(9): e249-e50.*

[5] ***Moioli V et al. (2019):*** *Mozhaisk haemoglobin variant effects on leukocyte differential channel using the Sysmex XN series. Clin Chem Lab Med 57(12): e324–e7*

[6] ***Mongelli F et al. (2016):*** *A rare and unstable hemoglobin variant, Hb M Dothan beta 25/26 (-GTG), detected by the anomalous cytogram on Sysmex XE-2100. Clin Chem Lab Med 54(2): e31–3.*

[7] ***Teixeira C et al. (2017):*** *Automated detection of unstable hemoglobin variants by Sysmex XE-Series analyzers. Clin Chem Lab Med 55(11): e243–e6.*

[8] ***Danise P et al. (2009):*** *Nucleated red blood cells and soluble transferrin receptor in thalassemia syndromes: relationship with global and ineffective erythropoiesis. Clin Chem Lab Med 47(12): 1539–42.*

[9] ***Urrechaga E et al. (2011):*** *Erythrocyte and reticulocyte parameters in iron deficiency and thalassemia. J Clin Lab Anal 25(3): 223–8.*

[10] ***Schoorl M et al. (2012):*** *Efficacy of advanced discriminating algorithms for screening on iron-deficiency anemia and beta-thalassemia trait: a multicenter evaluation. Am J Clin Pathol 138(2): 300–4.*

[11] ***White Paper:*** *Efficacy of advanced discriminating algorithms for screening on iron-deficiency anemia and beta-thalassemia trait: a multicenter evaluation. Am J Clin Pathol 138(2): 300–4.*

[12] ***Urrechaga E et al. (2017):*** *Critical appraisal of discriminant formulas for distinguishing thalassemia from iron deficiency in patients with microcytic anemia. Clin Chem Lab Med 55(10): 1582–91.*

[13] ***Merono F et al. (2011):*** *Analytical evaluation of the Tosoh HLC-723 G8 automated HPLC analyzer for hemoglobin analysis in beta-thalassemia mode. Clin Biochem 44(5-6): 441–3.*

[14] ***Al-Allawi NA et al. (2015):*** *Premarital screening for hemoglobinopathies: experience of a single center in Kurdistan, Iraq. Public Health Genomics 18(2): 97–103.*

[15] ***Sears DA et al. (2004):*** *Pappenheimer bodies: a brief historical review. Am J Hematol 75(4): 249–50.*

[16] ***Thomas L. (2020):*** *Clinical Laboratory Diagnostics 2020, 10th edition. TH-Books.*

[17] ***Jiang H et al. (2019):*** *Interferents of Automated Reticulocyte Analysis Integrated with Relevant Clinical Cases. Clin Lab 65(7).*

[18] ***Tomaiuolo G. (2014):*** *Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. Biomicrofluidics 8(5): 051501.*

[19] ***Lux SEt. (2016):*** *Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. Blood 127(2): 187-99.*

[20] ***Perrotta S et al. (2008):*** *Hereditary spherocytosis. Lancet 372(9647): 1411–26.*

[21] ***Flatt JF et al. (2020):*** *Expression of South East Asian Ovalocytic Band 3 Disrupts Erythroblast Cytokinesis and Reticulocyte Maturation. Front Physiol 11: 357.*

[22] ***Kato GJ et al. (2018):*** *Sickle cell disease. Nat Rev Dis Primers 4: 18010.*

[23] ***Mullier F et al. (2011):*** *Additional erythrocytic and reticulocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: results of a multicentre study. Ann Hematol 90(7): 759–68.*

[24] ***King MJ et al. (2015):*** *ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. Int J Lab Hematol 37(3): 304–25.*

[25] ***Bobée V et al. (2018):*** *Screening for hereditary spherocytosis in routine practice: evaluation of a diagnostic algorithm with focus on non-splenectomised patients. Ann Hematol 91(2): 301–2.*

[26] ***Sottiaux JY et al. (2020):*** *Evaluation of a hereditary spherocytosis screening algorithm by automated blood count using reticulocytes and erythrocytic parameters on the Sysmex XN-series. Int J Lab Hematol 42(2): e88–e91.*

[27] ***Bobee V et al. (2018):*** *Screening of hereditary spherocytosis and pyruvate kinase deficiency by automated blood count using erythrocytic and reticulocytic parameters. Int J Lab Hematol 40(6): 697–703.*

[28] ***Berda-Haddad Y et al. (2017):*** *Increased mean corpuscular haemoglobin concentration: artefact or pathological condition? Int J Lab Hematol 39(1): 32–41.*

[29] ***Nivaggioni V et al. (2020):*** *Use of Sysmex XN-10 red blood cell parameters for screening of hereditary red blood cell diseases and iron deficiency anaemia. Int J Lab Hematol 42(6): 697–704.*

[30] ***Nivaggioni V et al. (2021):*** *Detection of Southern Asian Ovalocytosis with Sysmex XN-10: A complement to the decision tree previously described. Int J Lab Hematol online ahead of print.*

Nos white papers sont téléchargeables sur notre site Internet :
www.sysmex.fr/whitepapers

Sysmex France S.A.S.
22 Avenue des Nations, ZAC Paris Nord 2, CS 51414 Villepinte, 95944 Roissy CDG Cedex, France · Téléphone +33 1 48170190 · Téléfax +33 1 48632350 · info@sysmex.fr · **www.sysmex.fr**

FR.C.10/22