

HÉMATIES HYPERDENSES ET SPHÉROCYTOSE

G. BRICTEUX (1), A. PANAGOPOULOS (2), J.M. PAULUS (3)

RÉSUMÉ : Une enfant de 12 ans, souffrant d'épisodes récidivants d'ictère et de douleurs abdominales, est hospitalisée en urgence. La patiente n'est pas anémique mais l'examen hématologique initial révèle un taux très élevé d'hématies hyperdenses (32 %; référence 0-2.5 %) et un taux des réticulocytes anormal ($201 \times 10^3/\mu\text{L}$; référence $29-84 \times 10^3/\mu\text{L}$), correspondant à une production érythrocytaire multipliée par un facteur de 3.5. Les mêmes anomalies hématologiques sont découvertes chez la mère de la patiente. L'examen du frottis sanguin montre des globules rouges à clarté centrale réduite et quelques sphérocytes. La fragilité osmotique des hématies n'est accrue qu'après incubation. Le diagnostic de sphérocytose héréditaire est établi par l'électrophorèse des protéines de membrane qui révèle une déficience isolée en bande 3, protéine qui lie la bicouche lipidique au cytosquelette sous-membranaire. Cet exemple de maladie hémolytique souligne la signification physiopathologique et l'intérêt diagnostique des hématies hyperdenses, qui signent la déshydratation cellulaire consécutive aux lésions membranaires.

HYPERDENSE RED BLOOD CELLS AND SPHEROCYTOSIS

SUMMARY : A 12-year old female, suffering from recurring episodes of icterus and abdominal pain, is hospitalized in emergency. She is not anemic but her hemogram reveals a high level of hyperdense red blood cells (32 %; controls 0-2.5 %) and an abnormal reticulocyte count ($201 \times 10^3/\mu\text{L}$; controls $29-84 \times 10^3/\mu\text{L}$), indicating a 3.5 fold increase in RBC production. The same abnormalities are found in the patient's mother. The blood smear shows few spherocytes. RBC osmotic fragility is increased only after incubation. Hereditary spherocytosis is diagnosed following electrophoresis of membrane proteins which reveals a deficiency in band 3, a protein which links the lipid bilayer to the cytoskeleton. This case of hemolytic anemia illustrates the physiopathologic and diagnostic significance of hyperdense RBC, which reflect the cell dehydration associated with the membrane disorder.

KEYWORDS : *Hereditary spherocytosis - Hyperdense red blood cells - Hyperchromic red blood cells*

INTRODUCTION

La sphérocytose héréditaire est découverte à Liège en 1871 par Vanlair et Masius, qui notent, chez une patiente ictérique présentant des douleurs qu'il attribuent à la splénomégalie, la petite taille et la forme parfaitement sphérique d'une large fraction des globules rouges (1). La fragilité osmotique accrue des sphérocytes est démontrée en 1907, le traitement par splénectomie est proposé en 1910 et le rôle de la rate dans l'hémolyse élucidé à partir de 1940. Plus récemment, les recherches moléculaires démontrent la perte de lipides membranaires et la déperdition de sodium érythrocytaire par les sphérocytes et, à partir de 1971, les défauts des protéines cytosquelettiques et transmembranaires des hématies.

Cependant la sphérocytose, qui donne son nom à la maladie, n'est pas toujours aussi apparente que dans le cas princeps. Nous décrivons ici une observation clinique où le diagnostic a été suspecté par l'abondance des hématies à haute concentration en hémoglobine, ("hématies hyperdenses") détectées au compteur automatique. Comme la sphérocytose, cette anomalie trouve sa cause dans un déficit de bande 3, la protéine transmembranaire échangeuse d'anions qui joue un rôle capital dans l'attachement de la bicouche lipidique au cytosquelette.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les paramètres érythrocytaires et réticulocytaires ont été déterminés par le compteur de cellules ADVIA (Bayer, Tarrytown, NY). Cet instrument mesure l'intensité de la lumière laser dispersée par des hématies traversant individuellement l'orifice de comptage. A un angle de mesure donné, cette intensité est fonction à la fois du volume et de la concentration en hémoglobine de l'hématie. Le compteur mesure simultanément cette intensité à deux angles et dérive le volume et la concentration en hémoglobine individuels de chaque hématie à partir d'une table stockant la relation entre les deux valeurs de dispersion (scatter) et les deux paramètres globulaires (2) (fig. 1). La moyenne de ces valeurs sur des milliers d'hématies fournit le volume globulaire moyen (MCV) et la concentration moyenne en Hb (MCHC). En outre, le compteur détermine le pourcentage des hématies dont la concentration est $\leq 28 \text{ g/dl}$ (% HYPO) ou $\geq 41 \text{ g/dl}$ (% HYPER) (3). Le CV analytique de ces mesures est de 4 à 8 % et varie en fonction du pourcentage des cellules anormales (4, 5).

La réticulocytose est déterminée par le même instrument à partir de la mesure de l'absorption en flux des hématies après coloration de l'ARN à l'oxazine 750. L'index de production érythrocytaire est égal au rapport de la réticulocytose du patient à celle de la moyenne des sujets contrôles ($58.8 \times 10^3/\mu\text{L}$), divisé par le temps de transit des réticulocytes en circulation. Ce dernier est obtenu à partir de l'hématocrite, la chute de celui-ci entraînant la libération de réticulocytes immatures. Le temps de transit varie linéaire-

(1) Chef de Service associé, (2) Candidat spécialiste, Département de Pédiatrie, CHU du Sart Tilman, Liège.
(3) Chef de service, Service d'Hématologie biologique, CHU du Sart Tilman, Liège.

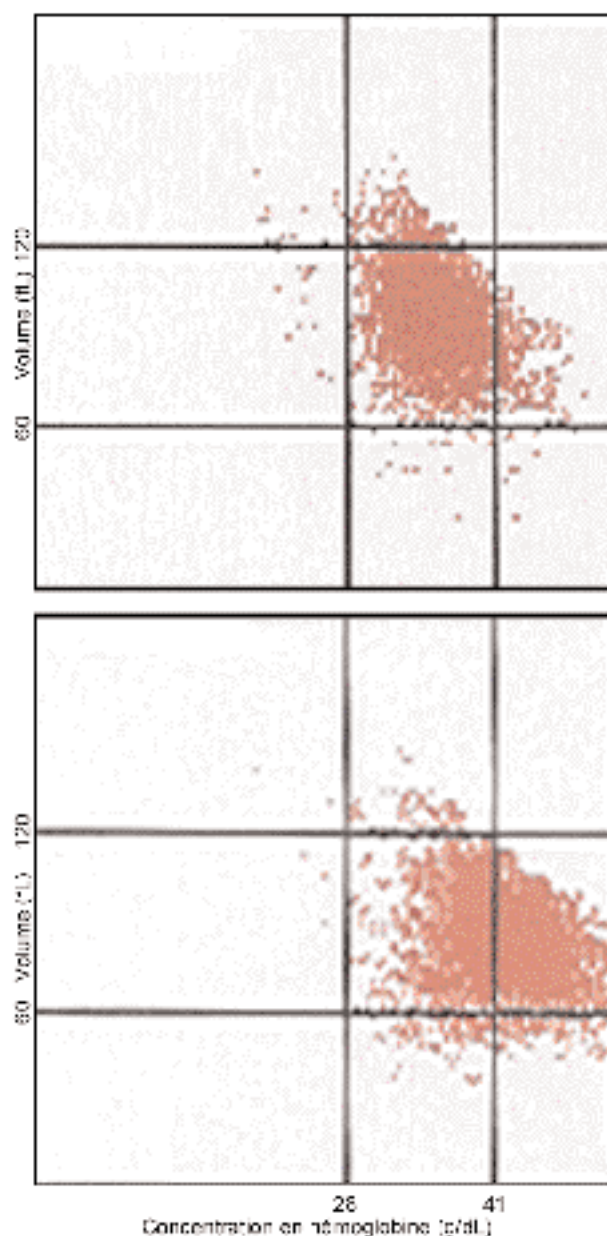


Fig. 1. Détermination cellule par cellule de la concentration en hémoglobine (en abscisse) et du volume (en ordonnée) des globules rouges. Chaque point représente une hématie. Les barres verticales et horizontales délimitent respectivement les concentrations en hémoglobine < 28 g/dl (hypochromies) et > 41 g/dl (hyperchromies; région des hématies hyperdenses), et les volumes < 60 fl (microcytoses) et > 120 fl (macrocytoses). En haut, cytogramme normal, où les 4 subpopulations représentent 0,4, 1,1, 0,2, et 3,3 % des hématies. La concentration moyenne en hémoglobine (MCHC) est 34,3 g/dl. En bas, cytogramme de la patiente, où ces subpopulations représentent 0,1, 32,0, 2,0 et 0,5 % des hématies. Le MCHC est 40,1 g/dl.

ment de 1 jour (hématocrite 45 %) à 2,5 jours (hématocrite 15 %) (6).

L'électrophorèse des protéines de membrane du globule rouge et le test de cryohémolyse ont été réalisés par B. Gulbis (Laboratoire de Chimie clinique, Hopital Erasme, Bruxelles) (7).

HISTOIRE CLINIQUE

K.D., âgée de 12 ans, se présente en urgence avec une symptomatologie de crampes épigastriques non irradiées, durant depuis 24 heures. Il n'y a ni vomissements, ni nausées. La patiente est afebrile, avec un appétit nettement diminué. Les douleurs cèdent après administration de spasmolytiques.

On note au niveau des antécédents maternels une grossesse à terme non compliquée, avec un poids à la naissance de 3 kg 150. On retrouve une notion d'épisodes fréquents de douleurs abdominales accompagnées de vomissements et d'ictère à partir de l'âge de 5 ans. Ces épisodes ont été attribués à une maladie de Gilbert. K.D. présente d'autre part un excès pondéral modéré, sans endocrinopathie primaire, ni répercussion métabolique.

Les antécédents familiaux sont marqués par la présence d'épisodes similaires de douleurs abdominales avec vomissements et ictère chez un cousin germain d'origine maternelle. Les parents sont en bonne santé.

L'examen clinique à l'admission montre une patiente en bon état général. Les paramètres sont les suivants : température 37°C, fréquence cardiaque 76/min. Tension artérielle : 140/110 mmHg, poids 51 kg; taille 146 cm. Un léger ictère conjonctival est noté. L'abdomen est non ballonné. Il existe une sensibilité à la palpation profonde de la fosse iliaque gauche, sans défense. Le foie et la rate ne sont pas palpés. Aucune masse abdominale n'est perçue. Le reste de l'examen clinique est sans particularité.

La radiographie d'abdomen à blanc est normale mais l'échographie abdominale met en évidence des lithiases au niveau de la vésicule. On note l'absence de dilatation des voies biliaires, la taille et l'échostructure normales du foie et de la rate.

La première analyse sanguine à l'admission donne les résultats indiqués au tableau I, qui, en l'absence d'anémie, montre deux anomalies: le taux extrêmement élevé d'hématies hyperdenses (%HYPER: 32 %; référence 0-2,5 %) (fig. 1) et le taux des réticulocytes anormal ($201 \times 10^3/\mu\text{l}$; référence $29-84 \times 10^3/\mu\text{l}$), correspondant à un index de production érythrocytaire de 3,5 (référence 0,5-1,7). On note, en outre, l'hyperbilirubinémie directe et indirecte ainsi que l'effondrement de l'haptoglobine. La demi-vie des hématies marquées au Cr^{51} est de 17 jours (référence 25-30 jours) avec hyperdestruction splénique. Les tests hépatiques sont perturbés, la sérologie pour les hépatites A, B, C et le CMV est normale.

TABLEAU I. RÉSULTATS BIOLOGIQUES.

Globules rouges (GR)	4.1	4.0-5.2 x 10 ⁶ /μl
Hémoglobine (Hb)	14.3	11.7-14.9 g/dl
Volume globulaire (MCV)	83.9	80-97 fl
Concentration moyenne en Hb (MCHC)	39.3	31.3-36.1 g/dl
Pour cent GR hyperchromes (%HYPER)	32.0	0.1-2.5
Réticulocytes	201	29-84 x 10 ³ /μl
Globules blancs	13.5	4.3-11.9 x 10 ³ /μl
Plaquettes	311	170-400 x 10 ³ /μl
Bilirubine totale	27.2	0-10.0 mg/l
Bilirubine conjuguée	10.3	0-3.0 mg/l
Haptoglobine	0.11	0.30-2.40 g/l
LDH	618	200-400 unités/l
Phosphatases alcalines	650	246-842 unités/l
GammaGT	196	0-50 unités/l
TGO	145	0-30 unités/l
TGP	175	0-30 unités/l
Protéines sériques	78	66-83 g/l

On se trouve donc devant un cas d'hémolyse compensée puisque les taux normaux de globules rouges et d'hémoglobine sont maintenus par une hyperproduction érythropoïétique. Une origine autoimmune est exclue par le test de Coombs négatif, une hémoglobinopathie et une enzymopathie par une électrophorèse normale de l'hémoglobine et les dosages normaux des enzymes érythrocytaires glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), pyruvate kinase (PK), 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD), hexokinase (HK) et glucose phosphate isomérase (GPI).

L'examen du frottis sanguin montre la présence de globules rouges à clarté centrale réduite, mais peu de microsphérocytes (fig 2). Par ailleurs, la résistance osmotique globulaire s'avère normale à trois reprises et ne révèle une anomalie qu'après incubation de 24 heures. L'autohémolyse correspond à un profil de type III, compatible avec une enzymopathie ou une sphérocytose. Le test de cryohémolyse est positif.

Finalement, c'est l'électrophorèse des protéines des membranes érythrocytaires (Dr B.

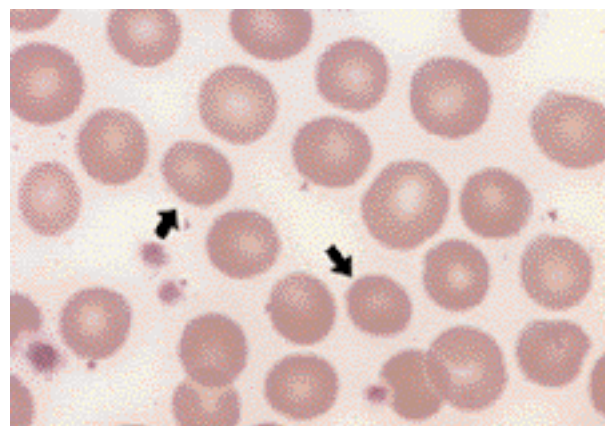


Fig. 2. Hématies et plaquettes de la patiente. Presque tous les globules rouges montrent une clarté centrale, qui n'est absente que dans les quelques sphérocytes (flèches).

Gulbis, Hôpital Erasme, Bruxelles) qui établit définitivement le diagnostic en révélant une déficience isolée de la protéine transmembranaire bande 3. Cette déficience entraîne une forme de sphérocytose héréditaire associée à une hémolyse compensée. Ce diagnostic permet donc d'affirmer que les épisodes antérieurs d'ictère associés à des douleurs abdominales et vomissements étaient dus à la maladie érythrocytaire et non pas à une maladie de Gilbert.

DISCUSSION

1. Sphérocytes et hématies hyperdenses

La sphérocytose héréditaire est due à une anomalie du cytosquelette du globule rouge. Sa prévalence est au moins de 1/2.000 dans la population nord-européenne. La transmission est autosomique dominante dans 75 % des cas. Dans le reste des cas, il s'agit soit d'une mutation spontanée, soit d'une transmission autosomique récessive ou autosomique dominante à pénétrance réduite.

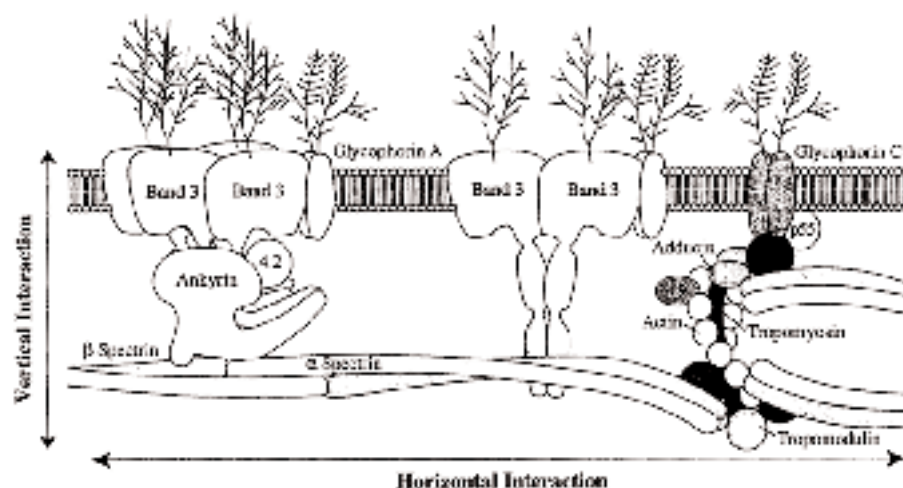


Fig. 3. Modèle schématique de la membrane érythrocytaire. A gauche, sont représentées les protéines qui interviennent dans les interactions verticales entre la bicouche lipidique et le cytosquelette et dont les mutations causent la sphérocytose héréditaire (bande 3, ankyrine, bande 4.2 et spectrine, surtout b). L'elliptocytose et la pyropoikilocytose héréditaires sont associées à des mutations des spectrines (surtout a) et de la protéine 4.1, qui assurent les interactions horizontales entre les composants du réseau cytosquelettique. Reproduit avec permission de Tse et Lux (18).

La sphérocytose héréditaire résulte de lésions biochimiques, isolées ou associées, au niveau de l'ankyrine (environ 45 % des cas), la spectrine (surtout b; 30 %), la bande 3 (20 %) ou plus rarement de la protéine 4.2 ou pallidine (5 %) (fig. 3). Ces protéines assurent les interactions verticales, perpendiculaires au plan de la membrane, entre la bicouche lipidique et le cytosquelette. Les mutations qui les atteignent fragilisent l'attachement entre ces structures (fig 4). Des vésicules de 0.2 à 0.5 μm , formées de lipides et de protéines exclusivement membranaires, se détachent. La réduction du rapport surface/volume cause la sphérocytose, la perte de la déformabilité des globules rouges et un ralentissement secondaire de leur transit à travers les sinusoides de la rate. La stase dans les sinusoides de la rate réduit l'utilisation du glucose et la formation d'ATP et expose les protéines membranaires aux radicaux libres libérés par les phagocytes activés. Elle conduit ainsi à un processus d'excision membranaire qui ne fait qu'accentuer la sphérocytose, jusqu'à ce que survienne la lyse cellulaire. Par ailleurs, la perte membranaire accroît la perméabilité aux cations monovalents, ce qui entraîne une hyperactivité de la pompe à sodium, dont l'effet net est une perte de Na^+ supérieure à l'entrée de K^+ (8). C'est le mécanisme de la déshydratation des hématies, qui explique l'augmentation de la concentration en hémoglobine (MCHC) et de la fréquence des hématies hyperdenses.

Chez notre patiente, le MCHC (concentration corpusculaire moyenne en Hb) est 39.3 g/dl (référence 31.3-36.1 g/dl). La détermination du pourcentage d'hématies hyperdenses (% HYPER) est plus sensible que celle du MCHC et détecte des pathologies mixtes où coexistent des souspopulations d'hématies hyperdenses et hypo-

denses, comme cela a été décrit dans des cas de thalassémie β (9). Quand la limite de 1.5 % est choisie pour détecter une augmentation anormale du taux de sphérocytes, la sensibilité et la spécificité de %HYPER sont toutes deux de 94 % (4). L'utilité du test est illustrée par le cas présent, où le taux de %HYPER était de 32 % (fig. 1) alors que le frottis sanguin était très peu suggestif d'une sphérocytose; on considère d'ailleurs que l'examen microscopique ne détecte les sphérocytes que dans environ 80 % des cas de sphérocytose héréditaire. Un avantage supplémentaire de la détermination de %HYPER sur l'examen microscopique est qu'elle est réalisée au cours de l'examen automatique de routine. Elle devrait aussi détecter la sphérocytose causée par des pathologies acquises, telles que les hémolyses d'origine extrinsèque dues aux brûlures, à certains venins, aux septicémies à *Clostridium perfringens* ou surtout aux hémolyses auto- ou alloimmunes. Chez 6 patients atteints d'hémolyse auto-immune, %HYPER a varié entre 4.6 et 27.9 % (4).

La sphérocytose est confirmée par le test de fragilité osmotique. Réalisé sur sang frais, il peut être normal (comme ce fut le cas chez notre patiente); après incubation, il est rarement normal dans les cas de sphérocytose, mais d'autres anomalies que la sphérocytose, notamment les enzymopathies, peuvent révéler une population de cellules anormalement fragiles. Le test de cryohémolyse, positif chez notre patiente, est considéré comme spécifique de la sphérocytose héréditaire, apparemment parce qu'il décèle le défaut moléculaire de la membrane, plutôt que l'altération de son rapport surface/volume (10).

La déshydratation érythrocytaire qui produit les hématies hyperdenses survient dans d'autres affections que la sphérocytose. Les hémoglobi-

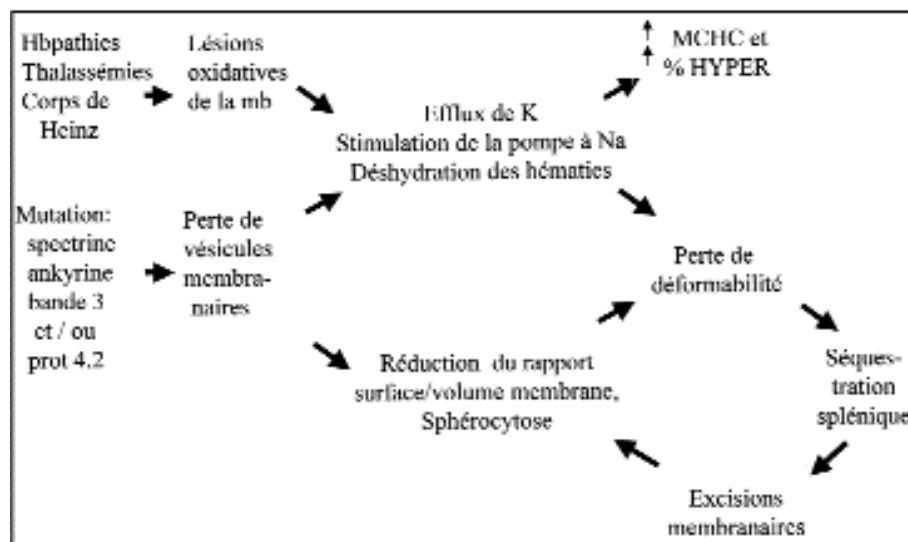


Fig 4. Mécanisme de la genèse des sphérocytes et des hématies hyperdenses. Le schéma est détaillé dans le texte.

nopathies SS, SC et CC (11), les thalassémies (9, 12), les hémoglobinopathies instables (13) et les anémies à corps de Heinz (13) ont une physiopathologie commune qui consiste en la formation de dépôts intracellulaires d'hème, de fer et de globines (hémichromes). Ceux-ci produisent des lésions oxydatives des protéines de membrane, notamment la bande 3, qui entraînent une fuite de potassium et une hyperactivité de la pompe à sodium, d'où la déshydratation et l'augmentation de densité d'une fraction des érythrocytes (13). L'excision de ces inclusions dans la rate produit des "hématies irrégulièrement contractées", des "bite cells" ("cellules mordues"). Comme le montre la figure 4, elle peut aussi causer la sphérocytose (14, 15). Dans tous ces cas, les mesures de %HYPER par double scatter peuvent avantageusement remplacer les mesures en gradient de densité de la distribution des concentrations en hémoglobine (3).

2. Aspects cliniques de la sphérocytose héréditaire

L'histoire clinique comprend classiquement la triade, anémie, ictère et splénomégalie. La symptomatologie varie suivant l'âge et la forme de la maladie. La majorité des patients sont symptomatiques à la période néonatale (ictère précoce). L'anémie accompagnant l'ictère est en général peu sévère. La réticulocytose et l'effondrement de l'haptoglobine ne sont pas systématiquement présents à la naissance, ce qui rend le diagnostic difficile. Environ 20-30 % des patients ont une symptomatologie peu sévère, le diagnostic passant inaperçu jusqu'à l'âge adulte où il est révélé par une complication, notamment les lithiases vésiculaires. Celles-ci surviennent parfois dès 3 ans et leur incidence augmente fortement avec l'âge, pour atteindre une fréquence de 75 % au-delà de 40 ans. Moins de 5 % des patients présentent une forme sévère avec anémie et besoins transfusionnels élevés justifiant une splénectomie.

D'autres formes d'anémie peuvent compliquer le tableau d'anémie hémolytique chronique. Une surinfection par le Parvovirus B19 (mégaérythème épidémique ou 5^{ème} maladie) peut entraîner une crise aplastique de résolution généralement spontanée en 10-15 jours. Une atteinte rénale associant azotémie et thrombocytopénie existe parfois, suggérant à tort le diagnostic de syndrome hémolytique urémique. Dans quelques cas, comme celui de Vanlair et Masius (1), il existe une pathologie des tissus nerveux ou musculaires, peut-être liée au fait que ceux-ci expriment la forme érythrocytaire de l'ankyrine et de la β -spectrine. Enfin la sphérocytose peut se compliquer d'une anémie

mégalo-blastique liée à un déficit en acide folique consécutif à l'hyperactivité de la moëlle.

Le traitement varie selon la symptomatologie et l'âge. Tous les patients doivent être supplémentés en acide folique (1 mg/j). La splénectomie est réservée aux formes sévères et entraîne une réponse dans 100 % des cas. On recommande actuellement de retarder l'opération jusqu'à l'âge de 5 ans en raison du risque de sepsis ("post-splenectomy syndrome") (16). Une vaccination contre le pneumocoque, l'*Haemophilus influenzae* et le méningocoque doit être réalisée au moins 2 semaines avant l'opération. L'introduction du nouveau vaccin heptavalent contre le pneumocoque (Prevnar aux USA) permettra peut-être d'envisager la splénectomie avant l'âge de 5 ans (17). Une antibioprophylaxie doit être administrée chez tous les patients splénectomisés et ceux-ci devraient être porteurs d'un bracelet d'identification.

RÉFÉRENCES

1. Vanlair CF, Masius JB.— De la microcythémie. *Bull Acad R Med Belg*, 1871, **5**, 515.
2. Tycko DH, Metz MH, Epstein EA, Grinbaum A.— Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration. *Appl Optics*, 1985, **24**, 1355-1365.
3. Mohandas N, Johnson A, Wyatt J, et al.— Automated quantitation of cell density distribution and hyperdense cell fraction in RBC disorders. *Blood*, 1989, **74**, 442-447.
4. Gilsanz F, Richard MP, Millan I.— Diagnosis of hereditary spherocytosis with dual-angle differential light scattering. *Am J Clin Pathol*, 1993, **101**, 119-122.
5. Bovy C, Tsobo R, Rorive G, et al.— Factors determining the percentage of hypochromic red blood cells in hemodialysis patients. *Kidney Int*, 1999, **56**, 1113-1119.
6. Hillman RS.— Characteristics of marrow production and reticulocyte maturation in normal man in response to anemia. *J Clin Invest*, 1969, **48**, 443-453.
7. Tshilolo L, Kagambega F, Sztern B, et al.— La sphérocytose héréditaire : bilan d'une année d'expérience de l'étude des protéines de la membrane érythrocytaire. *Rev Méd Brux*, 1998, **5**, 417-423.
8. Gallagher PG, Jarolim P.— Red cell membrane disorders, in Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al., ed. *Hematology. Basic principles and practice*. 3 ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000, 576-610.
9. Bunyataratvej A, Fucharoen S, Greenbaum A, Mohandas N.— Hydration of red cells in a and b thalassemias differs. *Am J Clin Pathol*, 1994, **102**, 217-222.
10. Streichman S, Gescheidt Y.— Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. *Am J Hematol*, 1998, **58**, 206-212.
11. Embury SH, Vichinsky EP.— Sick cell disease, in Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al., eds. *Hematology. Basic principles and practice*. 3 ed. Churchill Livingstone, New York, 2000, 510-554.

12. Shinar E, Rachmilewitz EA.— Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. *Semin Hematol*, 1990, **27**, 70-82.
13. Benz EJ.— Hemoglobin variants associated with hemolytic anemia, altered oxygen affinity, and methemoglobinemias, in Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al., eds. *Hematology: basic principles and practice*. 3 ed. Churchill Livingstone, New York, 2000, 554-561.
14. Bain BB.— *Blood cells. A practical guide*. 2 ed. Blackwell Science, Oxford, 1995.
15. Bull BS. Morphology of the erythron, in Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al., eds. *Williams Hematology*. 6 ed. McGraw-Hill, New York, 2001, 271-288.
16. Eber SW, Langendorfer CM, Ditzig M, et al.— Frequency of very late fatal sepsis after splenectomy for hereditary spherocytosis : impact of insufficient antibody response to pneumococcal infection. *Ann Hematol*, 1999, **78**, 524-528.
17. Overturf GD.— American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Technical report: prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics*, 2000, **106**, 367-376.
18. Tse WT, Lux SE.— Red blood cell membrane disorders. *Br J Haematol*, 1999, **104**, 2-13.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Dr.G. Bricteux, Département de Pédiatrie, CHU du Sart Tilman, 4000, Liège.