



HAL
open science

Optimisation du diagnostic de sphérocytose héréditaire au laboratoire d'hématologie biologique du CHRU de Nancy

Olivia Hajjar

► **To cite this version:**

Olivia Hajjar. Optimisation du diagnostic de sphérocytose héréditaire au laboratoire d'hématologie biologique du CHRU de Nancy. Sciences pharmaceutiques. 2020. hal-03298176

HAL Id: hal-03298176

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03298176v1>

Submitted on 23 Jul 2021

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2020

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement le :

19 octobre 2020

Par **Olivia HAJJAR épouse KIRSCH**
née le 08 septembre 1993 à Paris XIV^{ème}

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

**Optimisation du diagnostic de sphérocytose héréditaire au
laboratoire d'hématologie biologique du CHRU de Nancy**

Membres du Jury

Président :	Mme le Professeur B. FAIVRE	PU, Hématologie et biologie cellulaire
Directeur de Thèse :	M. le Docteur J. PERRIN	MCU-PH, Hématologie biologique
Juges :	M. le Professeur JY. JOUZEAU	PU-PH, Pharmacologie et toxicologie
	Mme le Docteur D. GERARD	AHU, Hématologie biologique

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2019-2020

DOYEN

Raphaël DUVAL

Vice-Doyen

Julien PERRIN

Directrice des études

Marie SOCHA

Conseil de la Pédagogie

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Présidente, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Présidente, Caroline GAUCHER

Chargés de Mission

Communication
Innovation pédagogique
Référente ADE
Référente dotation sur projet (DSP)

Marie-Paule SAUDER
Alexandrine LAMBERT
Virginie PICHON
Marie-Paule SAUDER

Responsabilités

Filière Officine
Filière Industrie
Filière Hôpital
Pharma Plus ENSIC
Pharma Plus ENSAIA
Pharma Plus ENSGSI
Cellule de Formation Continue et Individuelle
Commission d'agrément des maîtres de stage
ERASMUS

Caroline PERRIN-SARRADO
Julien GRAVOULET
Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Béatrice DEMORE
Marie SOCHA
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Xavier BELLANGER
Igor CLAROT
Luc FERRARI
François DUPUIS
Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE
Francine PAULUS
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON
Max HENRY
Pierre LEROY
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Claude BLOCK
Pierre DIXNEUF
Chantal FINANCE
Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Pierre LABRUDE
Vincent LOPPINET

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT
Marianne BEAUD
François BONNEAUX
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN

Philippe MAINCENT
Alain NICOLAS
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Francine PAULUS
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

Section CNU

*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Ariane BOUDIER □	85	Chimie Physique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie, Biologie cellulaire
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Loïc REPPPEL	82	Biothérapie
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Xavier BELLANGER ^{II}	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT ^{II}	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN ^{II}	86	Chimie thérapeutique
Cédric BOURA ^{II}	86	Physiologie

Sandrine CAPIZZI BANAS	87	Parasitologie
Antoine CAROF □	85	Informatique
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Natacha DREUMONT ^{II}	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAY ^{II}	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS ^{II}	86	Pharmacologie
Reine EL OMAR	86	Physiologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER ^{II}	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD ^{II}	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT ^{II}	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire

ENSEIGNANTS (suite)

Section CNU

*

Discipline d'enseignement

Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN ^{II}	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Arnaud PALLOTTA	86	Bioanalyse du médicament
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL ^{II}	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET ^{II}	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT ^{II}	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU ^{II}	87	Biochimie et Biologie moléculaire

PROFESSEUR ASSOCIE

Julien GRAVOULET	86	Pharmacie clinique
------------------	----	--------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

□ En attente de nomination

^{II} Maître de conférences titulaire HDR

*Disciplines du Conseil National des Universités :

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens

De coopérer avec les autres professionnels de santé

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

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

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

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Béatrice FAIVRE

PU, Faculté de Pharmacie de Nancy, Hématologie.

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Veillez recevoir l'expression de mon respect et de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Julien PERRIN

MCU-PH, Faculté de Pharmacie de Nancy, Service d'Hématologie Biologique – CHRU de Nancy.

Ton précieux enseignement m'a donné goût à l'hématologie et au métier de biologiste. Je te remercie pour ta disponibilité, ta gentillesse et ta pédagogie durant toutes ces années. Merci pour tes rigoureuses relectures et merci de m'avoir confié ce travail. Je tiens à t'exprimer mon profond respect et mon admiration à travers cette thèse. C'était un réel plaisir de travailler avec toi.

A Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU

PU, Faculté de Médecine de Nancy, Service de Toxicologie - CHRU de Nancy.

Vous me faites l'honneur de siéger à ce jury de thèse. Veuillez recevoir l'expression de mon respect et de ma sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur Delphine GERARD

AHU, Faculté de Pharmacie de Nancy, Service d'Hématologie Biologique – CHRU de Nancy.

Tu as toujours été un exemple pour moi depuis ces fameux cours au tutorat. Tu as été ma co-interne avec qui j'ai partagé les pauses goûters au labo et ensuite ma chef. Merci pour ces longues heures passées derrière le microscope à lire les myélogrammes, tu m'as beaucoup appris.

Je te remercie pour tes conseils et cette fois tu peux vraiment le dire : « le petit oisillon sort du nid ! »

A ma très chère Maman

Pour ton amour, ta présence et ton soutien de tous les instants, je te dédie ce travail en témoignage de mon éternel amour.

Tu as toujours su trouver les mots pour me rassurer et me booster en permanence.

Merci de m'avoir aidée à accomplir mes rêves et de m'avoir donné la force d'arriver jusqu'ici.

Sans toi, rien n'aurait été possible. Ma réussite est aussi la tienne.

A mon très cher Papa

Pour ton amour, ta pédagogie et ton infinie patience, je te dédie ce travail en témoignage de mon éternel amour. Tes précieux encouragements ont été pour moi une force extraordinaire.

Merci de m'avoir donné le goût du travail et de la persévérance et merci de m'avoir donné l'audace de dépasser toutes les difficultés au cours de mes études.

A mon tendre époux Mathias

Les mots ne suffisent pas pour exprimer l'amour que j'ai pour toi. Tu es l'épaule sur laquelle je m'appuie depuis plus de dix ans maintenant.

Merci pour ton aide et ta patience au quotidien qui m'ont permis de mener à bien cette thèse.

Tu es mon moteur et mon énergie.

Pour ton amour et pour tous les moments de bonheur que nous partageons ensemble chaque jour, je te dédie ce travail.

A ma sœur Chloé

Je pense qu'aujourd'hui je peux dire que j'ai réussi à suivre tes pas. Tu as été mon meilleur modèle. Je suis fier d'être ta sœur et je te remercie d'avoir toujours cru en moi. Je t'admire Dr Quinn !

Et à Alexis, mon beau-frère et confrère, pour les bons moments passés ensemble et ceux à venir.

A mon frère et confrère Emile

Toi et moi avons toujours été comme des jumeaux et comme cela n'a pas suffi nous avons fait les mêmes études ! Tu as toujours su me changer les idées et m'a toujours encouragée.

Merci pour ton optimisme, ta bonne humeur constante et ton réconfort.

A ma Téta et mon Jeddo

Pour votre amour et votre confiance en moi depuis que je suis toute petite.

A mes beaux-parents, Solange et Didier

Vous m'avez soutenue et choyée comme votre fille. Vous êtes ma deuxième famille.

Votre soutien inconditionnel et vos encouragements ont été d'une grande aide pour moi au cours de mes études. Je suis heureuse d'être une cerise aussi à présent !

A toute ma formidable famille

Qui a toujours cru en moi et en ma réussite.

Aux belles rencontres pendant mon internat :

A Méli

Avec qui j'ai partagé de nombreux stages et surtout ces fameux DU ! Toutes ces révisions au microscope les samedis matins avec toi vont me manquer !

A Clémence, Amy, Hélène, Marine, Sophie, Anne Sophie, Anita, Adèle, Anne Julie, Charlotte, Marion, Mathieu, Derick, Romain, Julien, Tom,

C'était un plaisir de travailler avec vous.

Pour votre bonne humeur et pour nos apprentissages ensemble, j'espère que l'on se croquera pour travailler ensemble à nouveau.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance :

A Vivianne

Merci pour ta gentillesse durant mes stages d'hémato et merci de m'avoir aidée à réaliser mes manip de thèse et toutes ces solutions de Pink test !

Aux techniciens d'hématologie

Pour leur bienveillance envers moi et pour leur sourire à chacun de mes stages.

A tous mes amis de la fac et d'ailleurs

A tous ceux que je n'ai pas cités mais que je n'ai évidemment pas oubliés !

Je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	3
LISTE DES TABLEAUX	4
LISTE DES FIGURES	5
INTRODUCTION	6
PARTIE 1 : MALADIE DE MINKOWSKI-CHAUFFARD OU SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE	7
1 La sphérocytose héréditaire : une pathologie de la membrane érythrocytaire	7
1.1 Structure de la membrane érythrocytaire	7
1.1.1 Les lipides membranaires	8
1.1.2 Les protéines membranaires et du cytosquelette	9
1.2 Interactions membranaires	12
2 La sphérocytose héréditaire : une maladie génétique	15
2.1 Mode de transmission.....	15
2.2 Etude des gènes et des protéines impliqués dans la sphérocytose héréditaire	15
3 Physiopathologie de la sphérocytose héréditaire	20
3.1 Mécanisme de microvésiculation	21
3.2 Dynamique splénique dans la sphérocytose héréditaire.....	21
3.3 Mécanisme de compensation de l'hémolyse	23
4 Diagnostic clinique de la sphérocytose héréditaire.....	24
4.1 Phénotypes variables	24
4.2 Description clinique	25
5 Stratégie thérapeutique	27
5.1 Traitement étiologique	27
5.2 Traitement symptomatique.....	28
6 Complications de la sphérocytose héréditaire	30
6.1 Lithiase biliaire pigmentaire.....	30
6.2 Crise de déglobulisation aiguë	30
6.3 Crise aplasique ou syndrome d'Owren-Gasser	30
7 Diagnostic différentiel	31
7.1 Les anémies hémolytiques acquises d'origine immune	31
7.2 L'elliptocytose héréditaire.....	31
7.3 La stomatocytose héréditaire.....	32
7.4 L'ovalocytose du sud-est asiatique	33

7.5	La dysérythropoïèse congénitale de type II.....	33
PARTIE 2 : ETAT DES LIEUX DES STRATEGIES DIAGNOSTIQUES DE LA SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE ET RECOMMANDATIONS ACTUELLES.....		
1	Diagnostic biologique de la sphérocytose héréditaire	35
1.1	Hémogramme	35
1.2	Frottis sanguin	36
1.3	Tests utilisés pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire.....	38
1.3.1	Ektacytométrie en gradient osmolaire.....	38
1.3.2	Test de fragilité osmotique des hématies	40
1.3.3	Cytométrie en flux : test à l'EMA.....	43
1.3.4	Electrophorèse des protéines membranaires	46
1.3.5	Recherche des mutations	47
2	Recommandations actuelles pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire	49
PARTIE 3 : AMELIORATION DU PROTOCOLE EMA AU CHRU DE NANCY.....		
1	Évaluation de la réduction du nombre de lavages pré-marquage	53
2	Évaluation de la réduction du nombre de tubes à faire pour le patient et pour le témoin lors de l'incubation avec l'EMA	54
3	Évaluation de la réduction du nombre de lavages post-marquage.....	55
PARTIE 4 : EVALUATION DU DIAGNOSTIC DE SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE PAR PINK TEST		
1	Matériels et méthodes	56
1.1	Préanalytique	56
1.2	Analytique	56
1.3	Post analytique	58
2	Validation de méthode	58
2.1	Répétabilité.....	58
2.2	Fidélité intermédiaire	59
2.3	Évaluations des performances du test	60
2.3.1	Caractéristiques du test et courbe ROC.....	61
2.3.2	Analyse du coût.....	64
3	Discussion.....	65
CONCLUSION GENERALE		68
BIBLIOGRAPHIE.....		69
ANNEXES.....		75

LISTE DES ABREVIATIONS

AGLT : acidified glycerol lysis test

ATP : adénosine triphosphate

AUC : area under curve

CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

CDA : dysérythroïèse congénitale de type II

CV : coefficient de variation

EDTA : acide éthylène diamine tetra-acétique

EFS : établissement français du sang

EMA : eosin-5'-maleimide

EPO : érythropoïétine

ID max : index de déformabilité maximale

NaCl : chlorure de sodium

ROC : receiver operating characteristic

VGM : volume globulaire moyen

VPN : valeur prédictive négative

VPP : valeur prédictive positive

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Etude des gènes impliqués dans la sphérocytose héréditaire (19)	15
Tableau 2 - Fréquence des gènes mutés dans la population Nord Européenne (21).....	16
Tableau 3 - Pathologie selon la protéine atteinte (22).....	16
Tableau 4 - Caractéristiques clinique et moléculaire des gènes mutés dans la sphérocytose héréditaire (23)	16
Tableau 5 - Classification des phénotypes de sphérocytose héréditaire (23).....	24
Tableau 6 - Récapitulatif des examens biologiques pour le dépistage de sphérocytose héréditaire.....	46
Tableau 7 - A : Sensibilité des tests chez des patients atteints de sphérocytose héréditaire en fonction du déficit biochimique. B : Sensibilité des tests combinés chez des patients atteints de sphérocytose héréditaire (61).....	51
Tableau 8 - Mode opératoire du pink test	57
Tableau 9 - Essai de répétabilité du pink test.....	59
Tableau 10 - Essai de reproductibilité du pink test	60
Tableau 11 - Moyennes et écarts types des paramètres de l'hémogramme de la population totale étudiée	61
Tableau 12 - Moyennes et écarts types des paramètres de l'hémogramme chez les patients confirmés sphérocytose héréditaire	61
Tableau 13 - Évaluation du pink test.....	62
Tableau 14 - Évaluation du test EMA	62
Tableau 15 - Performances diagnostiques du pink test et de l'EMA.....	63

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Morphologie des hématies chez un sujet sain observé au microscope électronique à gauche et au microscope optique à droite (4)	7
Figure 2 - Schéma simplifié d'une coupe transversale de la membrane érythrocytaire (7)	8
Figure 3 - Associations des sous unités de la spectrine pour former un hétérodimère (en haut) et un tétramère (en bas) (12)	11
Figure 4 - Représentation des interactions verticales et horizontales de la membrane érythrocytaire (15)	12
Figure 5 - Examen au microscope électronique de préparations du squelette de la membrane érythrocytaire (15).....	14
Figure 6 - Traversée d'une hématie saine dans un cordon splénique vers un sinus veineux à travers un passage très étroit dans la rate (21).....	20
Figure 7 - Effets physiopathologiques de la sphérocytose héréditaire (23).....	21
Figure 8 - Frottis sanguin d'un patient atteint d'elliptocytose héréditaire (4).....	31
Figure 9 - Frottis sanguin d'un patient atteint de stomatocytose (4).....	32
Figure 10 - Frottis sanguin d'un patient atteint d'ovalocytose héréditaire avec présence de stomato-ovalocytes en « double bouche » (flèches noires) (4)	33
Figure 11 - Bi nucléation des érythroblastes au myélogramme d'un patient atteint de dysérythropoïèse congénitale de type II (47).....	34
Figure 12 - Données moléculaires et biologiques de la sphérocytose héréditaire (23)	36
Figure 13 - Frottis sanguin chez des patients atteints de sphérocytose héréditaire dus à des déficits de la membrane différent (23).....	37
Figure 14 - Ektacytométrie en gradient osmolaire chez un sujet atteint de sphérocytose et chez un sujet sain	39
Figure 15 - Ektacytométrie en gradient osmolaire chez 4 patients atteints de sphérocytose héréditaire (49)	39
Figure 16 - Graphique représentant le pourcentage d'hémolyse en fonction de l'osmolarité du milieu (50)	41
Figure 17 - Représentation graphique du test EMA (60)	44
Figure 18 - Différents globules rouges capturés sur le logiciel IDEAS (62).....	45
Figure 19 - Représentation schématique d'électrophorèses SDS-PAGE (12)	47
Figure 20 - Exemple de résultats représentant la fluorescence en fonction du nombre de lavages pour 2 témoins et 3 patients atteints de sphérocytose héréditaire	54
Figure 21 - Exemple de résultats représentant la fluorescence en fonction du nombre de lavages pour 3 témoins et 2 patients atteints de sphérocytose héréditaire	55
Figure 22 - Différents aspects de courbes ROC et potentiel diagnostique d'un test (72)	63
Figure 23 - Courbe ROC du pink test.....	64
Figure 24 - Arbre décisionnel pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire au CHRU de Nancy.....	66

INTRODUCTION

La sphérocytose héréditaire, appelée aussi maladie de Minkowski-Chauffard, est l'anémie hémolytique héréditaire régénérative la plus fréquente en Europe du Nord et en Amérique du Nord. Reconnue pour la première fois en 1871 par Vanlair et Masius qui décrivent des « microcytes de forme parfaitement sphérique » (1), elle porte le nom des deux auteurs qui apportèrent une contribution décisive à sa connaissance : Minkowski qui en fait une description clinique en 1900 et Chauffard qui en 1907 découvrit l'augmentation de la fragilité globulaire à l'hémolyse par les solutions hypotoniques. Son incidence est de 1/5000 voire 1/2000 naissances dans les populations caucasiennes (2) (3). Il s'agit d'une maladie constitutionnelle du globule rouge très hétérogène en ce qui concerne la sévérité clinique, les anomalies moléculaires sous-jacentes et le mode de transmission. La pathogénèse est en lien avec les cinq protéines du cytosquelette de la membrane érythrocytaire qui régulent la déformabilité et l'élasticité des érythrocytes. Sa transmission est majoritairement autosomique dominante (75 % des cas), mais il existe des formes à transmissions récessives ainsi que des mutations *de novo*.

Le diagnostic de sphérocytose héréditaire est basé sur les antécédents familiaux, les signes cliniques, la présence de sphérocytes sur le frottis sanguin et les tests réalisés au laboratoire. Les principales caractéristiques clinico-biologiques de la sphérocytose héréditaire sont une anémie hémolytique, de sévérité variable (de bien compensée à graves et nécessitant parfois des transfusions sanguines), un ictère variable et une splénomégalie. Toutefois, il est parfois difficile de confirmer le diagnostic en raison d'une importante hétérogénéité clinique et des performances de certains tests.

Ce travail a pour objectif l'optimisation du diagnostic de sphérocytose héréditaire au laboratoire d'hématologie biologique du CHRU de Nancy. Tout d'abord, nous nous intéresserons à cette pathologie de la membrane érythrocytaire. Ensuite, nous détaillerons les stratégies diagnostiques et les recommandations actuelles. Enfin, nous évaluerons le diagnostic biologique de sphérocytose héréditaire par pink test dans le but de mettre en place cette technique au laboratoire.

PARTIE 1 : MALADIE DE MINKOWSKI-CHAUFFARD OU SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE

1. La sphérocytose héréditaire : une pathologie de la membrane érythrocytaire

L'hématie est une cellule anucléée qui contient une métalloprotéine pigmentée appelée hémoglobine. Son rôle majeur est le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus. Elle provient des érythroblastes de la moelle osseuse, et des réticulocytes à la fin de leur maturation. Sa durée de vie est d'environ 120 jours. Elle se présente sous la forme d'un disque biconcave d'environ 2 μm d'épaisseur et 7 μm de diamètre comme l'indique la figure 1 (4).

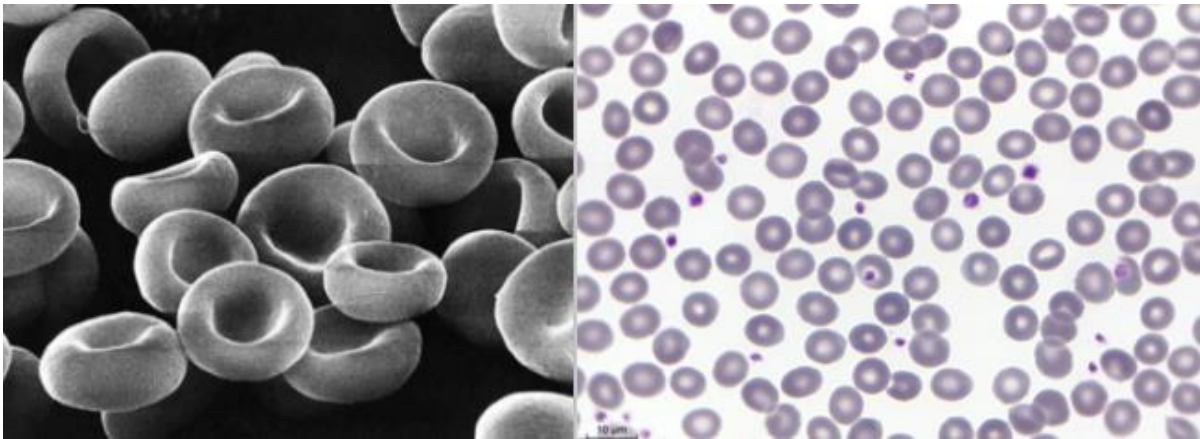


Figure 1 - Morphologie des hématies chez un sujet sain observé au microscope électronique à gauche et au microscope optique à droite (4)

Les hématies ne peuvent survivre qu'en s'adaptant sans cesse aux conditions physiques et chimiques de la microcirculation. Cette adaptation se fait grâce à sa membrane érythrocytaire qui lui assure sa forme biconcave, sa plasticité et sa déformabilité (5).

1.1 Structure de la membrane érythrocytaire

L'analyse des systèmes macromoléculaires a permis de conclure à une structure lipidique en mosaïque fluide, dans laquelle les protéines sont dispersées (6). Effectivement, elle est composée d'une bicouche phospholipidique (feuillet externe et interne) sous laquelle est ancré un réseau de protéines appelé le cytosquelette (figure 2) (7). Le squelette membranaire est formé par un ensemble de protéines dont l'intégrité et les interactions avec les autres composants membranaires protéiques et lipidiques définissent son intégrité et les possibilités d'adaptation aux différents vaisseaux sanguins.

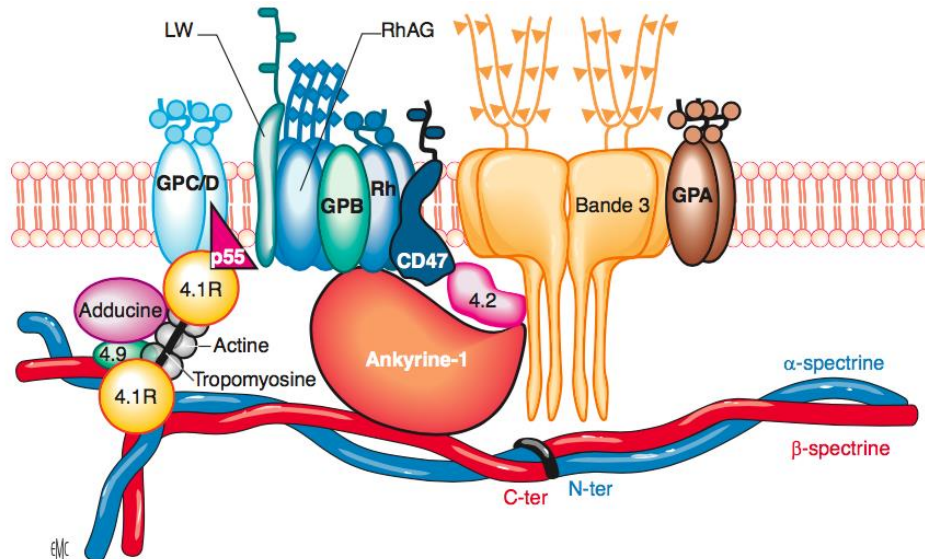


Figure 2 - Schéma simplifié d'une coupe transversale de la membrane érythrocytaire (7)

Les « arborescences » vers l'extérieur de la cellule, sont des glycanes. Ces glycanes, mais aussi les parties polypeptidiques exposées à l'extérieur, portent des antigènes de groupes sanguins. Les protéines Rh sont le centre du « complexe Rh », constitué en outre de la *Rh-associated glycoprotein* (RhAG), de la protéine CD47, de la protéine LW et de la glycophorine B (GPB).

1.1.1 Les lipides membranaires

La bicouche lipidique est constituée principalement de phospholipides (60 %) (8). Les phospholipides sont disposés en une double couche dans laquelle la chaîne aliphatique de la molécule est éloignée du milieu aqueux, tandis que les groupements polaires des têtes hydrophobes se trouvent en contact direct avec le milieu externe et le cytoplasme. Les chaînes d'acides gras des phospholipides de chaque feuillet se font face à l'intérieur de la bicouche, constituant la partie hydrophobe. Les têtes polaires sont disposées vers le plasma (feuillet externe) ou le cytoplasme (feuillet interne). La répartition des lipides dans la double couche n'est pas homogène puisque l'on trouve préférentiellement la sphingomyéline (18 %) et la phosphatidylcholine (17 %) dans le feuillet externe, la phosphatidyléthanolamine (18 %) et la phosphatidylsérine (7 %) dans le feuillet interne. Ces molécules lipidiques sont très mobiles, mais seulement à l'intérieur de leur propre couche. En effet, les phospholipides ont tendance à changer d'emplacement malgré la difficulté pour les têtes polaires de franchir la barrière hydrophobe de la bicouche. Cette dynamique permet de conserver une asymétrie de composition phospholipidique dans les deux feuillets de la bicouche. Cette asymétrie est importante sur le plan fonctionnel. Cette bascule (ou phénomène de « flip-flop ») est hyper lente d'un feuillet à l'autre et est favorisée par des enzymes ATP-dépendantes et des translocases. Par exemple, les translocases des aminophospholipides, appelées les flippases, catalysent la bascule des aminophospholipides du feuillet externe vers l'interne et assurent la fluidité membranaire.

Les autres composants lipidiques sont le cholestérol non estérifié (25 %), les sphingolipides (11 %) et les glycolipides (4 %). Le cholestérol est exclusivement sous forme libre. Sa répartition est régulière dans la membrane. Il est présent sur les deux feuillets de la bicouche phospholipidique. Les sphingolipides localisés dans le feuillet externe exclusivement, sont des récepteurs ou des antigènes.

La capacité de synthétiser les lipides est perdue lors de la maturation érythrocytaire au stade de réticulocyte mais les besoins membranaires sont compensés par l'échange très actif des lipides membranaires avec ceux du plasma. Les cholestérols libres globulaires et plasmatiques forment un pool unique en échange permanent. Cet échange ne demande pas de fourniture d'énergie d'origine érythrocytaire : il est entièrement sous la dépendance de la lécithine cholestérol-acyl transférase plasmatique qui transfère un acide gras de la lécithine au cholestérol qui se trouve ainsi estérifié. Incubées à 37°C dans du plasma normal, en présence de glucose, les hématies normales perdent du cholestérol : la surface membranaire diminue et les hématies deviennent des sphérocytes, forme répondant à la surface minimale pour un volume constant. Cette transformation disque-sphère est réversible : incubées dans un plasma dont la lécithine cholestérol-acyl transférase a été détruite par chauffage, les hématies déplétées du cholestérol regagnent celui-ci et reprennent leur forme biconcave (9).

1.1.2 Les protéines membranaires et du cytosquelette

Les protéines sont des composants essentiels des membranes. Elles forment le squelette de la membrane érythrocytaire. Ce squelette est pour une grande partie impliquée dans la forme de l'hématie. Il s'agit d'un assemblage de protéines entrelacées en mailles régulières et tapissant la face interne de la bicouche. Elles assurent la stabilité de cette mosaïque lipidique fluide (6).

Les protéines transmembranaires sont insérées dans la bicouche, qu'elles peuvent traverser. Parmi les protéines transmembranaires on distingue la protéine bande 3, la glycophorine A et glycophorine C. Elles sont impliquées dans le transport d'ions et de petites molécules organiques. On distingue 3 domaines :

- Le domaine extracellulaire qui possède les antigènes de groupes sanguins.
- Le domaine intramembranaire est constitué par une ou plusieurs hélices qui traversent la bicouche.
- Le domaine cytoplasmique interagit avec les protéines périphériques.

La stabilité est assurée par ce réseau protéique complexe de protéines périphériques dont les principales sont la spectrine, l'ankyrine, l'adducine, la protéine 4.1 et la protéine 4.2.

Les principales protéines transmembranaires ou protéines extrinsèques sont :

- la protéine bande 3 (ou protéine érythrocytaire échangeuse d'anions) qui est la protéine transmembranaire la plus abondante (environ 25 à 30 % des protéines membranaires) et à l'origine de maladies génétiques diverses. Son poids moléculaire est de 95 000 Da. Elle est codée par le gène EPB3 situé sur le bras long du chromosome 17. Elle est constituée de 911 acides aminés et est clivée par la trypsine en deux domaines fonctionnels spécifiques.

Le domaine N-terminal (extramembranaire et placé sur la face cytoplasmique de la membrane érythrocytaire) permet de moduler l'activité spécifique des protéines qui s'y fixent. Par exemple, l'ancrage des enzymes glycolytiques (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, aldolase, phosphofructokinase) conduit à l'inhibition de leur activité enzymatique. La protéine bande 3 joue également un rôle dans l'élimination des hématies. En effet, les hémichromes produits par l'oxydation et la dénaturation de l'hémoglobine se lient à la région cytoplasmique de la protéine bande 3, et déclenchent un processus d'agglutination de protéines dans la membrane érythrocytaire. Ces protéines sont alors reconnues par des anticorps autologues dirigés contre les épitopes de la protéine bande 3 et induisent ainsi l'élimination des hématies âgées ou altérées.

Le domaine C-terminal de la protéine bande 3 est responsable de l'activité de transporteur d'anions qui assure un efflux de HCO_3^- de la cellule, contre une entrée de Cl^- . Ce domaine est constitué par quatorze domaines transmembranaires. Sur une des boucles extracellulaires se trouve le site de glycosylation.

- La glycophorine A représente environ 1 à 2 % de la totalité des protéines membranaires. Elle a une masse moléculaire de 31 kDa. Le segment externe de la glycophorine A est formé des acides-aminés 1 à 72 à partir de l'extrémité N-terminale. Sur ce segment, sont fixés les radicaux oligosaccharidiques. Il possède les antigènes de groupe sanguin MN, les récepteurs pour le virus de l'influenza et les leptines. Le segment intramembranaire est formé par une hélice α simple. Le segment interne de la glycophorine A interagit avec le cytosquelette.

Le segment externe de la glycophorine C porte les antigènes de groupe sanguin Gerbich. La protéine 4.1 assure la liaison entre cette glycophorine et le cytosquelette. (10) (11).

- La spectrine est la protéine la plus abondante du squelette de la membrane érythrocytaire (environ 200 000 copies par cellule). Elle est constituée de deux chaînes α et de deux chaînes β qui sont codées respectivement par deux gènes SPTA1 et SPTB, situés sur les chromosomes 1q22-q23 et 14q23-q24.2. La chaîne α de la spectrine est formée de cinq régions (αI à αV). La chaîne β est formée de quatre régions (nommées βI à βIV). Ces 2 hélices sont en fait formées par 3 segments hélicoïdaux (formés par des répétitions de 106 acides aminés) liés par des structures non hélicoïdales donnant ainsi une formation en triple hélice. Les chaînes α et β s'associent dans un mode antiparallèle pour constituer un hétérodimère. (figure 3) (12).

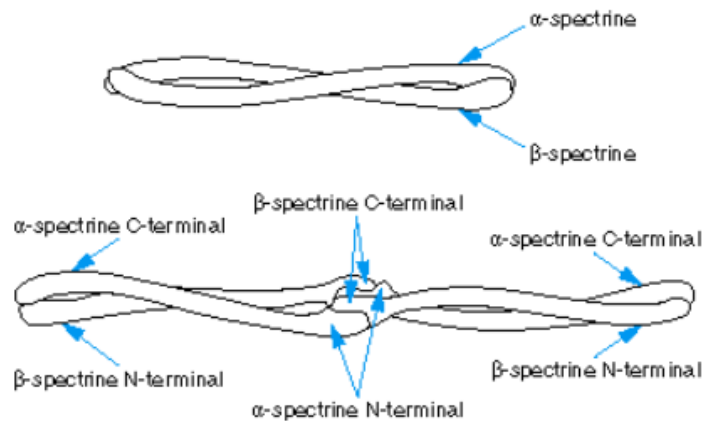


Figure 3 - Associations des sous unités de la spectrine pour former un hétérodimère (en haut) et un tétramère (en bas) (12)

- L'ankyrine est la principale protéine d'ancrage du cytosquelette. De poids moléculaire de 210 kDa, elle contient 1880 acides aminés. Elle est codée par le gène ANK1 situé sur le bras court du chromosome 8 dans la région 11.2 et contenant 42 exons. Trois régions structurales de la protéine ont été identifiées, correspondant à trois domaines fonctionnels différents :
 - o La région N-terminale possède deux sites de liaison pour la protéine bande 3 et d'autres protéines, comme la tubuline et la Na K - ATPase qui se lient aussi à ce domaine.
 - o Le domaine suivant contient le site de liaison à la spectrine.
 - o La portion C-terminale de l'ankyrine est considérée comme étant le domaine régulateur, car les tronctions et les coupures alternatives des introns qui peuvent arriver naturellement dans cette région modifient l'attachement de l'ankyrine à la spectrine et à la protéine bande 3.
- La protéine 4.1 est un composant clé du squelette. Elle a un poids moléculaire apparent de 78 kDa. Le gène codant pour cette protéine est localisé au niveau du chromosome 1p33-p34.2. Par digestion partielle à la trypsine, quatre domaines structuraux majeurs ont pu être identifiés, ayant des poids moléculaires de 30, 16, 10 et 22-24 kDa. Le domaine de 10 kDa se lie avec la sous-unité β de la spectrine et constitue ainsi un site de liaison à l'actine de moindre affinité et dépendant de la calmoduline. Le domaine de 30 kDa se lie aux protéines intégrales de membrane : protéine bande 3, glycopherine C. Le calcium, en association avec la calmoduline, joue un rôle dans la régulation de l'interaction du domaine de 30 kDa avec la protéine bande 3 et la glycopherine C (13). Il serait donc possible que cette protéine joue un rôle d'ancrage du réseau spectrine-actine du squelette à la membrane cellulaire similaire à celui de l'ankyrine. Cette protéine joue le rôle d'un double régulateur dans l'équilibre de la membrane cellulaire :
 - Son association avec la glycopherine C forme des ponts supplémentaires entre cytosquelette et membrane cellulaire ainsi que la formation des ponts ankyrine-bande 3 ;

- La déstabilisation de ce complexe met la protéine 4.1 en compétition directe avec l'ankyrine pour le site de liaison de la bande 3, en déstabilisant ainsi l'autre catégorie de ponts. Cela démontre le rôle crucial joué par la protéine 4.1 dans la régulation des propriétés mécaniques et la stabilité de la membrane des hématies.
- La protéine 4.2 est une protéine périphérique de 72 kDa. Elle représente environ 5 % du contenu protéique des membranes cellulaires. La fonction directe de cette protéine n'est pas claire, à part son interaction avec la protéine bande 3, *in vivo* et *in vitro*, qui pourrait stabiliser l'interaction protéine bande 3- ankyrine (14).
- L'adducine est une protéine qui se lie à l'actine et qui est considérée comme étant le facteur régulateur de la formation des réseaux spectrine-actine. Cette protéine n'intervient pas dans la sphérocytose héréditaire.

1.2 Interactions membranaires

Les données cliniques démontrent clairement l'importance cruciale de la forme des érythrocytes pour leur fonction principale de transport de l'oxygène. Cette forme discoïdale biconcave assure la plus grande surface possible, une très grande déformabilité et une résistance accrue aux forces hydrodynamiques complexes auxquelles les hématies sont soumises dans la circulation sanguine. Cette forme dépend du squelette membranaire. Il s'articule à travers des interactions dites horizontales et d'autres verticales (figure 4) (15).

Les principales protéines impliquées dans les interactions verticales sont la protéine bande 3, l'ankyrine, la spectrine et la protéine 4.2.

Quant aux interactions horizontales, elles ont lieu entre les chaînes α et β de la spectrine, la chaîne β de la spectrine et la protéine 4.1 et entre la protéine 4.1 et l'actine (16).

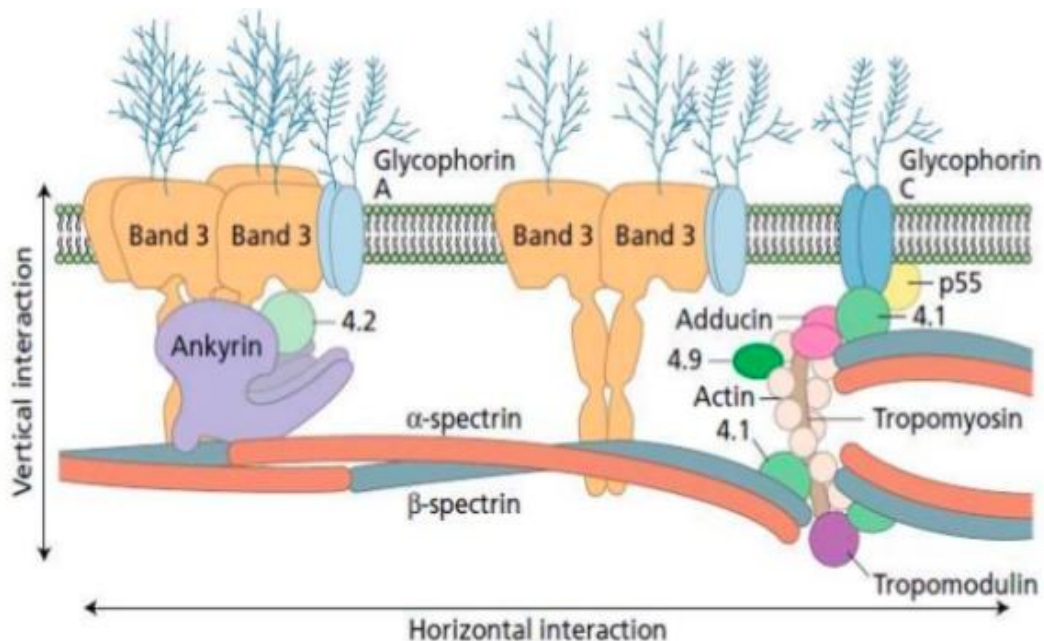


Figure 4 - Représentation des interactions verticales et horizontales de la membrane érythrocytaire (15)

Les interactions horizontales constituent la trame du cytosquelette et forment un réseau aux mailles régulières. La première interaction est assurée par l'association tête à tête des deux dimères de la spectrine en tétramère. Elle met en jeu les régions N-terminales (domaine $\alpha 1$) de la chaîne α . L'importance des interactions entre les dimères de la spectrine est bien démontrée par le fait que les anomalies de tétramérisation s'accompagnent en général d'une fragilité du cytosquelette conduisant à la perte de fragments membranaires et à une hémolyse. La seconde interaction correspond à la fixation de l'actine à la partie caudale du dimère de la spectrine par l'intervention de la protéine 4.1. L'ensemble forme le complexe ternaire. L'adducine, protéine liant la calmoduline, resserre également la liaison actine-spectrine.

A noter également que la β -spectrine est synthétisée en quantité plus faible que l' α -spectrine, limitant la quantité de dimères de spectrine disponible pour être incorporés dans le squelette membranaire.

L'élément essentiel du squelette protéique érythrocytaire est le réseau de tétramères de spectrine, qui se constitue par association d'hétérodimère α/β . Ce réseau tapisse le versant interne de la double couche lipidique à laquelle il est ancré par l'intermédiaire de complexes protéiques. Les interactions verticales fixent le réseau protéique sur la couche lipidique. Le domaine $\beta 2$ de la spectrine interagit avec la portion cytoplasmique de la protéine bande 3.

Cette interaction dite « verticale » assure au globule rouge la stabilité de sa membrane. Une faiblesse de cette interaction, secondaire à un déficit en l'une des protéines impliquées dans les complexes verticaux, est à l'origine de la sphérocytose héréditaire.

L'examen en microscopie électronique (figure 5) (15), de préparations du squelette de la membrane érythrocytaire, met en évidence la présence d'un réseau régulier hexagonal, ou plus rarement pentagonal ou heptagonal, dont les chaînes sont formées par des tétramères de spectrine, longues, qui font la liaison entre des filaments courts d'actine. La région N-terminale des sous-unités β permet la liaison entre filaments de spectrine et d'actine. La protéine 4.1 assure la stabilité de cette liaison en se liant également à la spectrine. Ce réseau de spectrine, interagit avec des molécules d'ankyrine. Celles-ci forment des ponts de liaison vers la protéine bande 3 présente dans la membrane cellulaire et relie ainsi les molécules de spectrine du cytosquelette à la membrane. Le site de la liaison de l'ankyrine a été localisé sur les répétitions 15 et 16 de la sous-unité β de la spectrine.

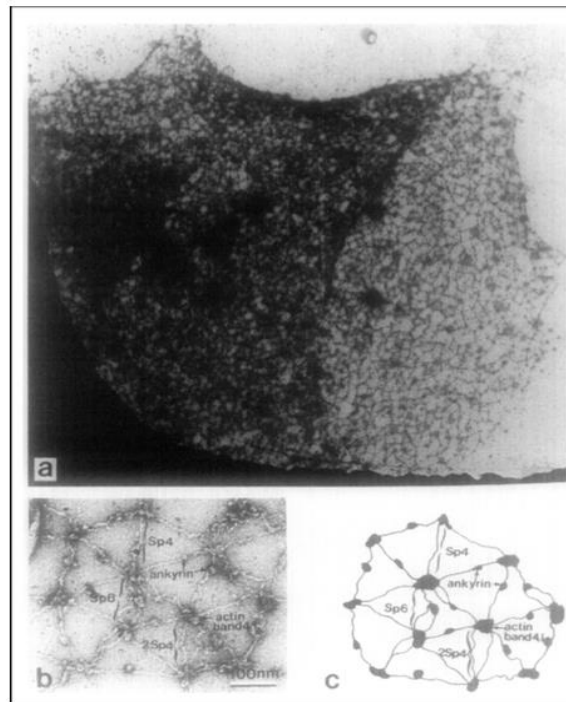


Figure 5 - Examen au microscope électronique de préparations du squelette de la membrane érythrocytaire (15)

Associé au « complexe bande 3 » (constitué de la protéine bande 3, l'ankyrine, la protéine 4.2 et la glycophorine A), il y a un complexe macromoléculaire appelé « complexe Rh » incluant cinq protéines : la glycophorine B, le polypeptide Rh, la glycoprotéine associée au Rh (RhAG), la glycoprotéine Landsteiner-Wiener et le CD47. Les protéines des groupes sanguins interagissent avec le réseau spectrine-actine et forment des systèmes d'ancrages pour le cytosquelette de l'hématie. Ce rôle est illustré par le domaine cytoplasmique de RhAG avec l'ankyrine et le domaine cytoplasmique de Lu et de XK avec des domaines différents de l' α -spectrine.

2. La sphérocytose héréditaire : une maladie génétique

2.1. Mode de transmission

Le mode de transmission héréditaire le plus fréquent (65-75 %) est le mode autosomique dominant. Ainsi, le porteur de la maladie est à l'état hétérozygote. L'enquête familiale permet de prouver la nature héréditaire de la maladie dans la plupart des cas. Dans 25 à 35 % des cas aucune anomalie hématologique caractéristique de la maladie n'est retrouvée chez les deux parents. Il s'agit alors soit d'une mutation *de novo* soit d'une transmission autosomique récessive. Le mode autosomique récessif est mis en évidence par la description de familles dont les parents sains ont plus qu'un enfant touché. Il se manifeste seulement à l'état homozygote et est associé à une anémie hémolytique sévère, une splénomégalie et des épisodes ictériques fréquents (17).

2.2. Etude des gènes et des protéines impliqués dans la sphérocytose héréditaire

Un catalogue de toutes les mutations responsables d'anomalies de la membrane érythrocytaire est disponible sur le site internet de the Human Gene Mutation Database (18).

Les gènes codant les protéines de la membrane érythrocytaire ainsi que leurs emplacements chromosomiques sont connus et sont présentés ci-dessous dans le tableau 1 (19) (20).

Tableau 1 - Etude des gènes impliqués dans la sphérocytose héréditaire (19)

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

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

Les différents gènes mutés sont répartis dans le tableau 2 selon leur fréquence dans la population Nord Européenne (21). En effet, la fréquence est différente dans d'autres populations, en Asie par exemple.

Tableau 2 - Fréquence des gènes mutés dans la population Nord Européenne (21)

Ankyrine (ANK1)	50-60 %
Spectrine (SPTB et SPTA)	20 %
Protéine bande 3 (EPB3)	15-20 %
Protéine 4.2 (ELB42)	< 5 %
Complexe Rh	< 1 %
Non identifié	10 %

Pour finir, une même protéine peut être responsable de plusieurs pathologies (tableau 3) (22).

Tableau 3 - Pathologie selon la protéine atteinte (22)

Protein (Gene)	Chromosomal location	Exons (number)	mRNA length (bp)	Disease
Alpha spectrin (<i>SPTA1</i>)	1q22-23	52	7999	HS, HE
Beta-spectrin (<i>SPTB</i>)	14q23-24.1	35	10 063	HS, HE
Ankyrin (<i>ANK1</i>)	8p11.2	43	8297	HS
Band 3 (<i>SLC4A1</i>)	17q21-22	20	4965	HS, SAO, CHC dRTA
Protein 4.1R (<i>EPB41</i>)	1p33-34.2	21	5930	HE
Protein 4.2 (<i>EPB42</i>)	15q15-21	13	4553	HS
RhAG (<i>RHAG</i>)	6p12-21	10	1912	OHSt
PIEZO1 (<i>FAM38A</i>)	16q24.2-16qter	51	1912	DHSt
Glut1 (<i>SLC2A1</i>)	1p31.3-35	10	3318	CHC
ABCB6 (<i>ABCB6</i>)	2q35-36	19	3016	FP

Nous allons décrire successivement ces mutations qui sont récapitulées dans le tableau 4 (23) suivant :

Tableau 4 - Caractéristiques clinique et moléculaire des gènes mutés dans la sphérocytose héréditaire (23)

	Patients with HS	Heredity	Prevalent mutations	Protein reduction	Disease severity	Peripheral blood smear
Ankyrin-1	USA and Europe 40-65%; Japan 5-10%	AD, AR, de novo	AD or de novo: null mutation; AR: mis-sense and promoter mutations	Spectrin and ankyrin-1 15-50%	Mild to moderate	Spherocytes
Band 3	20-35%	AD	Functionally null mutation	Band 3 15-35%	Mild to moderate	Spherocytes, occasional mushroom-shaped or pincer cells
α spectrin	<5%	AR	α -LEPRA allele and null mutation	α spectrin 50-75%	Severe	Spherocytes, contracted cells, and poikilocytes
β spectrin	15-30%	AD, de novo	Null mutation	β spectrin 15-40%	Mild to moderate	Spherocytes, 5-10% acanthocytes
Protein 4.2	USA and Europe <5%; Japan 45-50%	AR	Mis-sense (prevalence of 4.2 Nippon)	Protein 4.2 95-100%	Mild to moderate	Spherocytes, ovalostomatocytes

AD=autosomal dominant. AR=autosomal recessive. HD=hereditary spherocytosis. LEPRA=low-expression allele Prague.

Mutation du gène ANK1 :

Il s'agit de la mutation la plus fréquente dans la sphérocytose héréditaire caractérisé par une transmission dominante chez les populations nord-européennes (50 à 60 % des cas). Lorsque la mutation est présente, l'expression de l'ARNm de l'ankyrine est réduite considérablement. Cela aboutit à un défaut d'incorporation de la spectrine dans le squelette membranaire même si cette dernière est synthétisée en quantité normale. Il en résulte un déficit en spectrine secondaire au déficit en ankyrine. Ce déficit combiné représente le phénotype biochimique le plus fréquent (environ 60 % des cas). Il est dû à la diminution d'expression d'un allèle ANK1 causée soit par une inhibition de la transcription du gène de l'ankyrine, soit par une instabilité des mutants ARNm (24). Une délétion complète du bras court du chromosome 8 a été retrouvé dans un cas de sphérocytose héréditaire et confirmait cette association entre la spectrine et l'ankyrine. L'étude du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction a mis en évidence le rôle des formes mutantes de l'ankyrine sur une famille atteinte de sphérocytose héréditaire autosomale dominante. Cette analyse a prouvé un lien statistiquement significatif entre le polymorphisme de l'ankyrine et l'expression de la maladie (12). L'électrophorèse des protéines membranaires prouve un déficit combiné en ankyrine, en spectrine ainsi qu'en protéine 4.2. Le déficit de ces dernières protéines est dû à leur association à l'ankyrine (7). Les mutations non-sens et celles du cadre de lecture sont retrouvées à la sphérocytose héréditaire à transmission dominante. Les mutations situées dans le promoteur du gène ANK1 ou les substitutions ponctuelles concernent la sphérocytose héréditaire de transmission récessive. Des mutations de novo peuvent également toucher le gène ANK1.

Il est difficile de faire la différence entre les mutations *de novo* et les formes de sphérocytose à transmission récessive. Dans la sphérocytose héréditaire récessive, deux mutations identiques (homozygotes) ou non (hétérozygotes composites) doivent être présentes dans le génome du malade, et impliquent que les 2 parents soient porteurs d'une mutation.

Mutation du gène SPTB :

Le gène SPTB et ses mutations associées sont responsables de vingt pourcents des cas de sphérocytose héréditaire. Ce gène code pour la chaîne β de la spectrine. Ces mutations sont associées à des formes à transmission dominante. En revanche, les mutations *de novo* ne sont pas rares (1 %). Un grand nombre de mutations ont été élucidées dans le gène SPTB en comparaison au gène SPTA1. Il s'agit le plus souvent de mutations *null*, entraînant l'absence du lot haploïde de la chaîne β correspondante. L'arrêt prématuré de la traduction ou les mutations non-sens qui déplacent le cadre de traduction, sont à la base de la plupart des mutations, responsables de la déstabilisation de l'ARNm. Mais aussi de l'instabilité du produit de transcription (25). D'après Miraglia et coll. (26) qui ont étudié des cas de sphérocytose héréditaire chez des enfants italiens avec un déficit isolé en spectrine et dont les parents sont indemnes du point de vue clinique et hématologique, le mode de transmission serait associé à des mutations de novo d'un allèle β -spectrine. Ces mutations entraîneraient un déséquilibre quantitatif entre la β -spectrine et l' α -spectrine ce qui expliquerait la pathogénicité.

Mutation du gène EPB3 :

Les déficits en protéine bande 3 sont retrouvés dans environ 20 % des sphérocytoses héréditaires à l'état hétérozygote. Ce déficit est transmis selon un mode autosomique dominant. On retrouve un déficit en protéine 4.2 chez la plupart des patients et on distingue alors deux cas :

- Soit il s'agit d'une mutation hétérozygote du gène EPB3 responsable d'un déficit en protéine bande 3 conduisant à un déficit secondaire en protéine 4.2 proportionnel au déficit en protéine bande 3 ;
- Soit il s'agit d'une mutation rare du gène EPB3 touchant le site de liaison à la protéine 4.2. L'électrophorèse des protéines membranaires montre une diminution de moitié de la protéine 4.2 et une diminution limitée de la protéine bande 3. Le déficit initial de protéine bande 3 entraîne une mauvaise incorporation de la protéine 4.2 expliquant sa diminution secondaire. Son mode de transmission est récessif. Cette forme de sphérocytose héréditaire est différente de la forme émanant de mutations situées sur le gène ELB42 ci-dessous.

Il existe plusieurs types de mutations du gène EPB3. En effet, l'apparition d'un codon non-sens (bande 3 Lyon-Osnabrück 1) ou un décalage du cadre de lecture (bande 3 Foggia) ou une anomalie de l'épissage (bande 3 Pribam) aboutit à une non-synthèse de la protéine. D'autres sont des mutations faux sens souvent dans le domaine membranaire de la protéine bande 3 empêchant l'insertion dans la membrane de la protéine bande 3.

A l'état hétérozygote composite, la clinique est plus marquée. Un allèle faible accessoire, non exprimé à l'état hétérozygote simple et en trans de l'allèle EPB3 peut être retrouvé dans l'hétérozygotie composite. On peut par exemple citer l'allèle Lyon responsable d'une sphérocytose bénigne à l'état hétérozygote simple. En revanche, quand l'allèle Genas se met en trans de celui-ci alors la sphérocytose est aggravée et le déficit en protéine bande 3 est plus important (de même pour l'allèle Coimbra et Mondego) (27) (28).

Pour finir, seulement 3 cas homozygotes ont été rapportés chez l'Homme (29)(30). L'homozygotie provoque un *hydrops fetalis*, une sphérocytose gravissime et une acidose rénale tubulaire distale. Ces nouveaux nés ont besoin de traitements lourds pour survivre (réanimation, transfusions, apport de bicarbonates pour l'acidose). Le pronostic est mauvais de par la surcharge martiale qui survient et la nécessité d'une splénectomie précoce.

Mutation du gène ELB42 :

Le gène ELB42 code pour la protéine 4.2. Les mutations de ce gène restent rares dans la sphérocytose héréditaire. Elles provoquent une anémie hémolytique avec une absence totale de la protéine 4.2 et sans anomalie détectable de la protéine bande 3. Tous les cas signalés de mutations du gène ELB42 sont homozygotes avec des parents asymptomatiques évoquant une transmission récessive. A l'exception de deux formes (protéine 4.2 Lisboa et Notame) qui impliquent des mutations ponctuelles ce qui montre l'importance de la conformation spatiale

de la protéine 4.2 à une séquence en acides aminé exacte. Gallagher et Forget (31) ont rassemblé sept mutations décrites dans la littérature.

Mutation du gène SPTA1 :

Les mutations du gène SPTA1 sont retrouvées dans les formes récessives de sphérocytose héréditaire. Ce gène code la chaîne α de la spectrine. En effet, les chaînes α sont en excès par rapport aux chaînes β . Les patients hétérozygotes sont souvent des porteurs asymptomatiques. Aucun patient homozygote n'a été rapporté chez l'Homme. En revanche, il existe des souches de souris homozygote pour l'équivalent murin du gène SPTA1 qui sont atteintes de sphérocytose héréditaire sévère (32).

3. Physiopathologie de la sphérocytose héréditaire

L'érythrocyte se déplace tout au long de sa vie dans des micro-capillaires ou dans des pores de sinus vasculaire pour délivrer l'oxygène aux tissus. Il est donc indispensable qu'il puisse passer dans des zones où le diamètre est inférieur au sien. En effet, le globule rouge est de 7 μm mais il a la capacité de traverser des pores de 1 voire 0,5 μm (figure 6) (21).

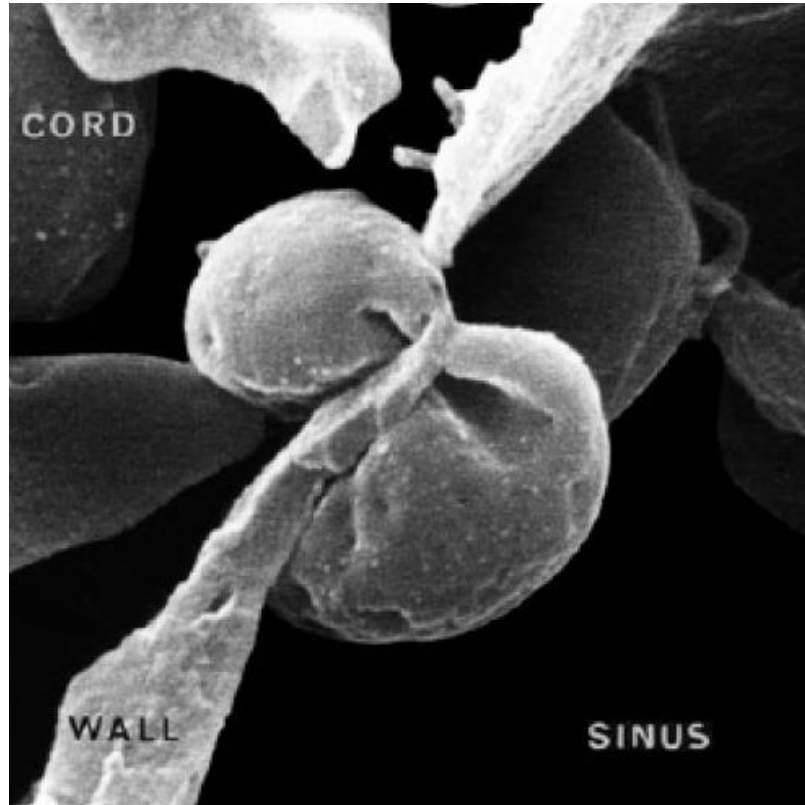


Figure 6 - Traversée d'une hématie saine dans un cordon splénique vers un sinus veineux à travers un passage très étroit dans la rate (21)

La déformabilité du globule rouge, déterminée en grande partie par un ratio surface/volume très élevé, permet sa circulation dans des vaisseaux de calibre étroit, comme les capillaires sinusoïdes de la rate. Ce réseau, situé dans la pulpe rouge splénique, est composé de cellules endothéliales séparées par des fibres de matrice extracellulaire. Pour rejoindre la circulation général, le globule rouge présent dans la pulpe rouge doit passer à travers les fentes inter-endothéliales en adoptant une forme « en huit ».

Le globule rouge a donc des capacités de déformabilité et d'élasticité pour s'adapter dans les zones contraignantes et pour retrouver sa forme biconcave lors de traversées plus dégagées. Néanmoins, si le globule rouge perd ses capacités de déformabilité et d'élasticité en raison d'une augmentation de la concentration en hémoglobine, d'une diminution du rapport surface/volume par perte de surface et d'une rigidité membranaire alors une hémolyse dans les lieux les plus contraignants tel que la rate (33).

3.1. Mécanisme de microvésiculation

Dans la sphérocytose héréditaire, une anomalie d'une des protéines du complexe vertical va perturber la liaison au cytosquelette et entraîner une déstabilisation de la bicouche lipidique ; celle-ci va former des vésicules qui vont se détacher de la membrane et aboutir à une perte de surface, à volume constant, et à une sphérisation du globule rouge, qui sera alors moins souple et moins déformable. Quelle que soit la protéine responsable, son déficit aboutit à une augmentation de la perméabilité aux cations monovalents et de l'ATPase qui gouverne leur échange. L'absorption accrue des ions sodium favorise l'entrée d'eau par osmose à l'intérieur du globule rouge. Ce dernier gonfle puis acquiert une forme sphérique appelée sphérocytes. La figure 7 ci-dessous schématise les mécanismes conduisant à la sphérisation de l'érythrocyte et à la perte de déformabilité (23), quel que soit le défaut moléculaire sous-jacent.

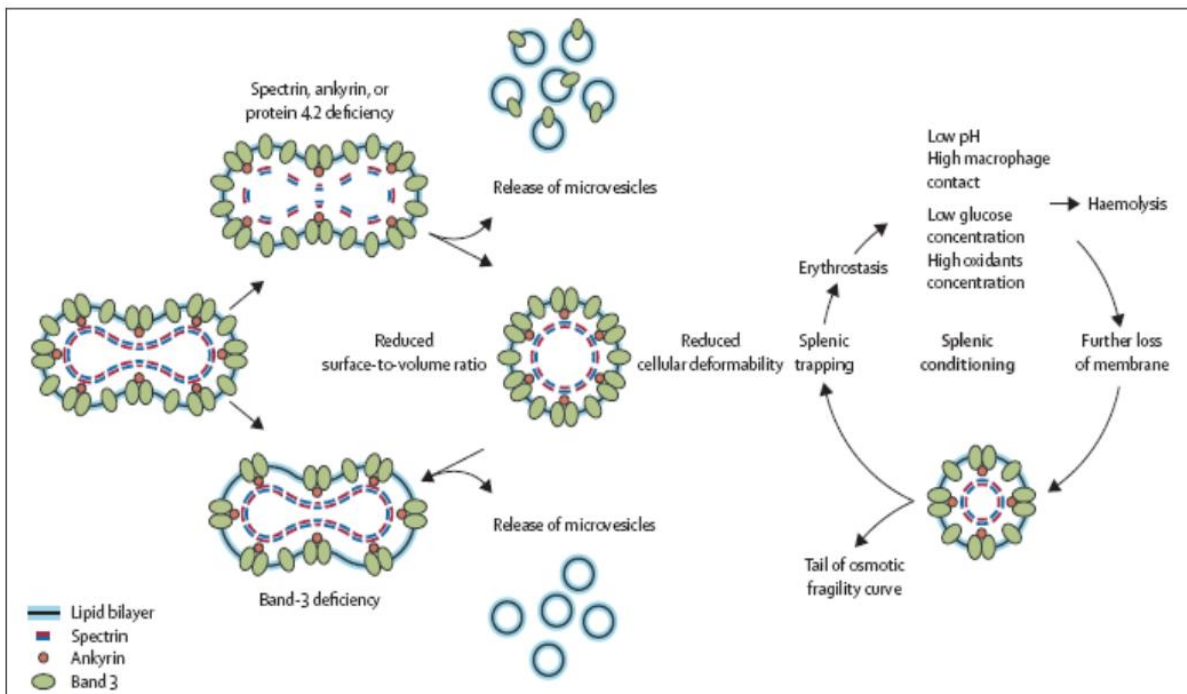


Figure 7 - Effets physiopathologiques de la sphérocytose héréditaire (23)

3.2. Dynamique splénique dans la sphérocytose héréditaire

La rate est l'organe dans lequel se déverse le sang artériel. Elle est constituée d'un réseau étroit formé par des cellules réticulées et des phagocytes. Les cellules sanguines sont alors prises au piège dans un labyrinthe qu'elles doivent traverser. Chez les patients sans anomalie de membrane, elles le sillonnent sans particularités par des passages simples et directs. Chez les patients atteints de sphérocytose héréditaire, les globules rouges anormaux vont aller dans une portion plus profonde de la rate où le flux sanguin est plus faible. Il s'agit de l'érythrocytose. Les érythrocytes vont alors stagner 15 à 150 minutes, contre 40 secondes à l'état non pathologique. Ainsi, l'érythrocyte va subir un « conditionnement splénique » grâce

à une circulation plus lente dans les sinusoides spléniques. Ce conditionnement correspond à un temps de contact augmenté avec les phagocytes (macrophages et cellules dendritiques spléniques), une diminution du pH, de l'adénosine triphosphate et du glucose, et une augmentation des oxydants dans l'environnement splénique va conduire à la lyse de l'érythrocyte (34). Ainsi le sphérocyte détenu dans les cordons spléniques en raison d'une diminution de surface, va être soumis à l'érythrocytose dans un environnement métabolique défavorable. Ensuite, les cellules sanguines vont rejoindre la circulation veineuse en passant par les sinus veineux. Ainsi, les globules rouges vont devoir être capables de se déformer pour les traverser (figure 6). Or, les sphérocytes ont perdu leur capacité de déformabilité. Ils seront ainsi piégés dans la rate. Les cellules vont alors gonfler en raison d'une entrée de d'ion chlorure et d'eau.

Chez les patients présentant une sphérocytose héréditaire, il existe deux populations de cellules au frottis : une population minoritaire de microsphérocytes de fragilité osmotique très grande et une population majoritaire dont la fragilité osmotique est à peine plus élevée que la normale. La rate semble en effet être un protagoniste actif dans la physiopathologie de la sphérocytose héréditaire et ne constitue pas seulement un filtre passif. On note en effet la disparition de cette population hyper fragile après splénectomie malgré la persistance de la sphérocytose. Le caractère splénique des sphérocytes ainsi que leur fragilité semblent ainsi induites par la rate.

A l'état normal, l'érythrocyte ne contient qu'une faible quantité de Na^+ et des quantités plus élevées de K^+ . L'ion sodium étant plus concentré dans le plasma, tend à rentrer passivement à l'intérieur du globule rouge en y entraînant de l'eau. Pour garder sa forme de disque biconcave, le globule rouge utilise une pompe à sodium (ATP dépendante) qui permet l'éjection active de sodium et d'eau. Cette pompe nécessite un apport suffisant de glucose et d'oxygène, un métabolisme glucidique intra-érythrocytaire normal et une quantité suffisante d'ATP. Dans la sphérocytose héréditaire, les hématies porteuses d'anomalies membranaires sont mises en défaut en raison d'une augmentation modérée de leur perméabilité au sodium. Les hématies prennent ainsi l'aspect d'une sphère due à l'accumulation de sodium et d'eau. Celle-ci est normalement régulée par la pompe à sodium ATP-dépendantes. Cependant lorsque la cellule manque d'ATP une fois tout le glucose consommé, cette pompe stoppe son activité et la teneur en ion sodium et en eau augmente.

En revanche la durée de séjour des sphérocytes dans les cordons spléniques ne soit pas suffisamment longue pour expliquer à elle seule l'hémolyse par les conditions métaboliques défavorables et l'érythrocytose. Il existe un phénomène d'auto-hémolyse en association avec la perte des lipides membranaires et la perméabilité au sodium. Enfin, le rôle des macrophages a également été suspecté dans la lyse des sphérocytes.

3.3. Mécanisme de compensation de l'hémolyse

L'érythropoïétine (EPO) est le facteur de croissance responsable de la régulation de la production des hématies. L'hypoxie tissulaire entraîne une augmentation de l'EPO. Les patients avec une forme bénigne de sphérocytose héréditaire sont capables de maintenir une concentration en hémoglobine normale malgré l'hémolyse. Ceci s'explique par l'augmentation de la synthèse d'EPO et une réponse optimale de l'érythropoïèse.

Rocha et al (35) ont cherché une corrélation entre les taux d'EPO et le type d'anomalies membranaires impliquées. Dans les déficits en protéine bande 3, une inhibition de la synthèse d'EPO serait impliquée avec des taux d'EPO plus bas. Dans les autres déficits, les taux d'EPO sont plus élevés confirmant ainsi une inhibition de la réponse à celui-ci. Pour finir, ils ont montré que la numération des réticulocytes ne se normalise pas au contraire des taux d'EPO. En effet, la splénectomie entraîne une meilleure survie des hématies conduisant ainsi à un retour du taux d'EPO à des valeurs normales.

4. Diagnostic clinique de la sphérocytose héréditaire

4.1. Phénotypes variables

Les phénotypes sont nombreux. Elle peut être asymptomatique ou à l'inverse provoquer des anémies graves ou plus rarement une anasarque foetoplacentaire et provoquer une mort *in utero*.

Quatre phénotypes de sphérocytose héréditaire se distinguent par la sévérité clinico-biologique (tableau 5) (23). Ils sont connus sous le nom de forme bénignes (20-30 % des cas), forme modérée (60-70 % des cas), forme modérée sévère (10 % des cas) et forme sévère (3 à 5 % des cas).

Tableau 5 - Classification des phénotypes de sphérocytose héréditaire (23)

	Mild	Moderate	Moderately severe	Severe*
Haemoglobin (g/L)	Normal	>80	60-80	<60
Reticulocytes	<6%	>6%	>10%	>10%
Bilirubin (µmol/L)	17.1-34.2	>34.2	>34.2-51.3	>51.3
Peripheral smear	Some spherocytes	Spherocytes	Spherocytes	Microspherocytes and poikilocytosis
OF (fresh blood)	Normal or slightly increased	Increased	Increased	Increased
OF (incubated blood)	Increased	Increased	Increased	Increased
Splenectomy	Rarely†	If physical ability is decreased or in some cases†	Necessary (at >5 years)	Necessary (at >2-3 years)
Transfusions	0-1	0-2‡	>2	Regular
SDS-PAGE (protein deficiency)	Normal	Sp, Ank+Sp, band 3, protein 4.2	Sp, Ank+Sp, band 3	Sp, Ank+Sp, band 3
Heredity	AD	AD, de novo mutation	AD, de novo mutation	AR

AD=autosomal dominant. Ank=ankyrin-1. AR=autosomal recessive. OF=osmotic fragility. SDS-PAGE=sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. Sp=spectrin. *Patients depend on regular transfusions. †Adults undergoing cholecystectomy or with pronounced jaundice. ‡Some patients need one or two transfusions during infancy.

Plusieurs critères permettent de classer la maladie :

- La concentration en hémoglobine ainsi que le taux de réticulocytes pour caractériser l'anémie
- La concentration en bilirubine libre
- La quantité de sphérocytes au frottis sanguin
- La fragilité osmotique avant et après incubation
- La fréquence des transfusions
- La protéine déficiente
- Le contexte familial héréditaire

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

Les mutations responsables de la sphérocytose héréditaire sont des mutations du cadre de lecture (délétions ou insertions de nucléotides), des mutations non-sens (arrêt de la traduction et production d'une protéine tronquée), des mutations faux sens (substitution d'une paire de base), des mutations du site d'épissage et des délétions du génome.

4.2. Description clinique

La sphérocytose héréditaire est caractérisée par une hétérogénéité clinique. En effet, il existe une hétérogénéité clinique interfamiliale encore mal élucidée : la même anomalie membranaire peut s'exprimer cliniquement différemment. Certains auteurs ont fait le lien entre la sévérité clinique et les anomalies membranaires spécifiques (19).

Au sein d'une même famille où la transmission est autosomique dominante, la symptomatologie est proche (19). En revanche, il existe tout de même une hétérogénéité clinique intrafamiliale chez les hétérozygotes composites. Des cas de sphérocytose héréditaire ont été décrits chez des patients atteints de déficits isolés en spectrine ou en protéine bande 3.

Le diagnostic se fait le plus souvent durant l'enfance ou chez l'adulte jeune. En revanche, si la maladie est peu bruyante cliniquement elle peut être découverte fortuitement. En effet, l'hémolyse peut être compensée par une érythropoïèse augmentée. Le diagnostic peut être réalisé devant des complications de la maladie tels que la lithiase biliaire pigmentaire du sujet jeune ou devant une érythroblastopénie due au parvovirus B19 mais aussi à l'occasion d'événement intercurrents (infections, grossesse...) amplifiant l'hémolyse.

Les signes cliniques sont peu spécifiques mais il existe une symptomatologie classique d'anémie hémolytique avec pâleur, ictère ou subictère, et splénomégalie. La sévérité de la maladie est liée à l'hémolyse et à la splénomégalie.

L'anémie hémolytique chronique est due d'une part à la circulation splénique entraînant une destruction accrue des sphérocytes. Ainsi, l'hémolyse augmente après la naissance. C'est à partir de ce moment que la rate assure pleinement son rôle de filtre des hématies difformes en permettant leur phagocytose. Un autre facteur est la baisse brutale de l'érythropoïèse à la naissance alors qu'elle est intense chez le fœtus. Le principal mécanisme physiologique responsable de la réduction de l'érythropoïèse est une diminution importante de la sécrétion d'EPO. Cette diminution de sécrétion est sans doute due au passage d'une sécrétion d'EPO hépatique à une sécrétion rénale et à la forte élévation du taux d'oxygène lors du passage d'une respiration fœtale à une respiration pulmonaire. Un nouveau-né atteint de sphérocytose héréditaire doit donc faire face à un taux d'hémolyse accru et à une réponse de son érythropoïèse inappropriée. Tout ceci aboutit donc à une aggravation de l'anémie qui nécessite souvent un besoin transfusionnel. Vers l'âge d'un an, l'hémolyse chronique est bien compensée sans nécessité de support transfusionnel dans la plupart des cas.

L'hémolyse des sphérocytes associé à la faible capacité du foie du nouveau-né à conjuguer la bilirubine expliquent l'apparition d'un ictère. La bilirubine libre voit sa concentration augmenter rapidement au niveau sanguin, pouvant ainsi aboutir à un ictère nucléaire (19). L'hémoglobine est normale à la naissance mais il y a une chute rapide des taux d'hémoglobine dans le premier mois après la naissance. A l'enfance et à l'âge adulte, on note une jaunisse persistante, une anémie, une splénomégalie et parfois des calculs biliaires. L'hémolyse peut être compensée chez l'adulte (22).

Pour finir, cette maladie rare doit être évoquée devant tout ictère et/ou anémie hémolytique (après élimination d'une incompatibilité fœto-maternelle érythrocytaire).

5. Stratégie thérapeutique

L'attitude thérapeutique a peu évolué au cours des dernières années. Elle est différente selon la forme de sphérocytose héréditaire. Dans plus de 50 % des cas une abstention thérapeutique car le patient est asymptomatique. Le traitement se limite à un simple suivi clinique avec hémogramme régulier (fonction de la valeur de l'hémoglobine). Chez les patients avec des phénotypes plus graves, le traitement peut aller d'une simple correction des carences vitaminiques à une transfusion, une splénectomie avec ou sans cholécystectomie, une photothérapie et une exsanguinotransfusion.

5.1. Traitement étiologique

Le traitement étiologique consiste en la splénectomie principalement et en la cholécystectomie.

L'hémolyse majoritairement splénique explique l'intérêt de la splénectomie dans cette pathologie. L'indication de splénectomie a fait l'objet de recommandations récentes (36) (37). Elle est formelle dans les formes sévères de sphérocytose, avec anémie profonde et/ou dépendance transfusionnelle. Ces formes se diagnostiquent souvent tôt, chez le jeune enfant. Les mutations hétérozygotes composites (spectrine α) ou homozygotes (bande 3 par exemple) sont responsables de ces tableaux cliniques sévères. La réalisation d'une splénectomie peut être indiquée dans les formes modérées, mais doit être discutée individuellement en fonction de la symptomatologie : retentissement du syndrome anémique sur la qualité de vie, asthénie marquée, diminution des performances scolaires chez les jeunes enfants, complications de l'hémolyse chronique, telles que lithiases à répétition, splénomégalie douloureuse ou ictère marqué. Elle n'est en revanche jamais indiquée dans les formes mineures, asymptomatiques. Les recommandations récentes définissent la place de la splénectomie totale indiquée à partir de 6 ans dans les formes sévères (36) (37). La place de la splénectomie subtotale est controversée, mais elle pourrait être une option dans les formes sévères avant l'âge de 6 ans. La splénectomie subtotale consiste en la résection partielle de la rate, laissant en place le pôle inférieur afin de maintenir des fonctions immunitaires spléniques. La plus large série publiée à ce jour est une étude monocentrique rétrospective réalisée au CHU Bicêtre (38), menée sur une cohorte de soixante-dix-neuf patients, ayant tous bénéficié d'une splénectomie subtotale, et suivis pendant une durée médiane de onze ans. La réponse hématologique est supérieure à 90 %, et tous les patients initialement dépendants des transfusions ont obtenu une indépendance transfusionnelle. Cependant, la persistance de l'hémolyse induit, d'une part, la repousse du moignon splénique, parfois source de douleurs spléniques invalidantes et de rechute de l'anémie, et d'autre part un taux élevé de lithiases vésiculaires. Une totalisation a été nécessaire chez vingt patients (25 %), en raison d'une rechute de l'anémie, d'un moignon symptomatique ou d'un ictère persistant. Les bénéfices de la splénectomie subtotale ont été surtout convaincants dans les formes sévères de l'enfant, permettant d'obtenir l'indépendance transfusionnelle chez tous. Même si la moitié de ces formes sévères ont nécessité une totalisation par la suite, celle-ci a été réalisée plusieurs années après la splénectomie subtotale, à un âge où le risque infectieux est bien moindre.

Il existe dans la rate une population de lymphocytes B produisant des immunoglobulines M dirigées contre des antigènes composant la capsule de certaines bactéries comme le pneumocoque, le méningocoque ou *Haemophilus influenzae*. L'absence de ces lymphocytes B entraîne un déficit immunitaire secondaire se traduisant par une susceptibilité aux infections à germes encapsulés. Le risque de sepsis sévère post-splénectomie est significativement plus élevé chez les patients splénectomisés que dans la population générale. La réalisation d'une splénectomie totale est habituellement contre indiquée chez les enfants avant cet âge, en raison du risque infectieux maximal. La prévention du risque infectieux présente trois axes : éducation du patient, antibioprophylaxie et vaccination. Les patients doivent être sensibilisés à ce sur risque infectieux et doivent porter sur eux une carte mentionnant son statut de splénectomisé. L'antibioprophylaxie par pénicilline V doit être systématique, et poursuivie pendant au moins deux ans après la chirurgie. Les patients doivent être vaccinés, avant la splénectomie dans la mesure du possible, contre le pneumocoque, le méningocoque et *Haemophilus influenzae*. La vaccination antigrippale est également recommandée, en raison du risque de surinfection bactérienne. Ces mesures de prévention permettent de contrôler le risque de sepsis précoce. Cependant, le risque infectieux persiste à long terme (39). Le risque thromboembolique veineux est augmenté au cours des premiers mois après la splénectomie, où l'on observe des thromboses veineuses profondes des membres inférieurs pouvant se compliquer d'embolie pulmonaire, ainsi que des thromboses splanchniques (veines spléniques et porte).

Enfin, la cholécystectomie peut être réalisée en cas de complication secondaire à la présence de calculs et en cas de lithiase (même asymptomatique) au moment de la réalisation d'une splénectomie. La cholécystectomie systématique en association à la splénectomie reste controversée en l'absence de lithiase biliaire (40).

5.2. Traitement symptomatique

Le traitement symptomatique repose sur la supplémentation en folate, la transfusion sanguine l'administration d'érythropoïétine, une photothérapie voire une exsanguino-transfusion.

La supplémentation en folates est recommandée dans les formes sévères et modérées de la maladie, à la dose de 2,5 mg par jour avant l'âge de cinq ans et 5 mg par jour ensuite.

La transfusion sanguine est réservée aux anémies mal tolérées ou au traitement de l'ictère néonatal. Le seuil du taux d'hémoglobine recommandé pour indiquer une transfusion est généralement de 7 à 8 g/dL. Même si la transfusion s'avère très efficace elle n'est pas sans risque. Le patient peut s'immuniser malgré la recherche d'agglutinines irrégulières avant chaque transfusion. Cette immunisation érythrocytaire se manifeste par une hémolyse intravasculaire et intratissulaire. De plus, il y a un risque de transmission de maladies infectieuses. En outre, les transmissions itératives peuvent donner des hémochromatoses post-transfusionnelle. En effet, en plus du fer transfusé s'ajoute le fer libéré par les globules rouges hémolysés. Celui-ci s'accumule au fil du temps au niveau des organes (rate, foie, pancréas, cœur) et peut menacer le pronostic vital.

Cette complication de la transfusion est prévenue par l'espacement des transfusions voire à l'utilisation d'un chélateur du fer (deferoxamine) associé à une supplémentation en vitamine C.

L'érythropoïétine recombinante administrée provoque une augmentation brutale de la réticulocytose et évite les transfusions. Ces injections se font trois fois par semaine. Administrée précocement chez le nouveau-né anémié atteint de sphérocytose héréditaire, elle pourrait permettre de diminuer les besoins transfusionnels. Cependant l'utilisation de l'érythropoïétine par voie sous-cutanée comporte un risque infime d'érythroblastopénie auto-immune liée à l'apparition d'anticorps anti-érythropoïétine agissant à la fois sur l'érythropoïétine exogène et sur l'érythropoïétine endogène. Il est donc difficile de recommander ce traitement en première intention chez le nouveau-né (41).

Pour finir, l'hyperbilirubinémie dans l'ictère est traitée par photothérapie. Une exsanguino-transfusion peut éventuellement être associée en cas d'évolution défavorable.

6. Complications de la sphérocytose héréditaire

La plupart des complications décrites ci-dessous sont dues à une hyperplasie érythroïde qui est la conséquence directe de l'hémolyse chronique.

6.1. Lithiase biliaire pigmentaire

Il s'agit de la complication la plus fréquente de la sphérocytose héréditaire. C'est une lithiase pigmentaire de bilirubinate de calcium. Elle est secondaire à une hyperproduction de bilirubine. La probabilité d'apparition d'une lithiase augmente avec l'âge. Une étude chez des adultes atteints de sphérocytose héréditaire a montré une incidence de 37 à 43 % de lithiases détectables par ultrasonographie (42). Ces auteurs préconisent donc une ultrasonographie biliaire annuelle. La lithiase biliaire est le plus souvent vésiculaire mais elle peut être située au niveau du canal cholédoque. Chez l'enfant, cette lithiase biliaire est de découverte fortuite dans la plupart des cas. Chez l'adulte, elle se manifeste par des coliques hépatiques. Enfin, une lithiase biliaire peut se compliquer d'angiocholite : la cholestase peut se rajouter à un ictère hémolytique (hyperbilirubinémie libre) (43) (44).

6.2. Crise de déglobulisation aiguë

Les crises de déglobulisation sont les manifestations habituelles de la sphérocytose héréditaire. Elles apparaissent dans les formes atténuées que dans les formes avec anémies chroniques. Elles constituent une cause considérable de morbidité par leur sévérité et leur fréquence de survenue. La crise de déglobulisation aiguë est le résultat d'une exacerbation brutale de l'hémolyse avec accentuation de l'ictère, de l'anémie régénérative et de l'hépatosplénomégalie. Elle est souvent observée en association avec des infections virales ou bactériennes. Au niveau clinique, on note une altération de l'état général, une hyperthermie, un ictère et une splénomégalie. Ces signes peuvent s'accompagner d'une hémoglobinurie due à la destruction globulaire intense.

6.3. Crise aplasique ou syndrome d'Owren-Gasser

Il s'agit d'une érythroblastopénie appelée aussi syndrome d'Owren-Gasser. Le Parvovirus humain B19 est le plus souvent incriminé. Il a une affinité pour les précurseurs de la lignée érythroïde de par son récepteur membranaire (globoside). Il provoque une hypoplasie érythroblastopénique brutale par inhibition de la prolifération des précurseurs érythrocytaires. Il provoque ainsi une anémie aiguë arégénérative d'une dizaine de jours. La crise est souvent précédée par des manifestations des voies aériennes supérieures ou un état pseudo grippal avec arthralgies. Une anémie normochrome normocytaire avec une discrète leucopénie et une thrombopénie est observée. Le myélogramme est peu utile mais confirme une atteinte de la lignée érythroïde. Après dix jours, il apparaît une crise réticulocytaire avec myélémie, polynucléose et thrombocytose. L'évolution spontanée est possible mais l'intensité de l'anémie nécessite souvent des transfusions.

L'infection par le parvovirus B19 entraîne la production d'anticorps et donc une immunité durable. Les patients qui ont déjà eu une crise n'en présenteront pas une nouvelle au cours de leur vie (45).

7. Diagnostic différentiel

Les sphérocytes ne sont pas spécifiques de la sphérocytose héréditaire (cf partie suivante). En effet, au cours des pathologies qui sont décrites ci-dessous, nous pouvons avoir des globules rouges hyperdenses avec une fragilité osmotique plus élevée.

7.1. Les anémies hémolytiques acquises d'origine immune

Les anémies hémolytiques d'origine immune sont définies par la fixation d'anticorps à la surface des hématies. L'anémie peut être auto-immune ou liée à une incompatibilité fœto-maternelle (système ABO ou Rhésus). Cette fixation immune forme un complexe antigène-anticorps sur la membrane du globule rouge. Les hématies sensibilisées subissent une phagocytose partielle par les macrophages. L'apparition de sphérocytes est liée à une perte de membrane par phagocytose partielle du complexe antigène-anticorps.

L'étude du frottis sanguin et de la fragilité osmotique (résistance globulaire et éktacytométrie) sont très proches des résultats obtenus dans la sphérocytose héréditaire. La biologie montre une anémie, des signes d'hémolyse et surtout la présence d'auto-anticorps anti-érythrocytaire démontré par un test de Coombs direct érythrocytaire positif (ou présence d'une incompatibilité fœto-maternelle). Ainsi, le contexte est différent et les anomalies disparaissent souvent avec un traitement contrairement à la sphérocytose héréditaire.

7.2. L'elliptocytose héréditaire

L'elliptocytose héréditaire désigne la présence d'hématies en forme d'ellipse appelés elliptocytes (figure 8) (4). Elle est due à des problèmes d'interaction horizontale des protéines du cytosquelette (spectrine et protéine 4.1) comme dans la sphérocytose héréditaire. La majorité des malades sont asymptomatiques.

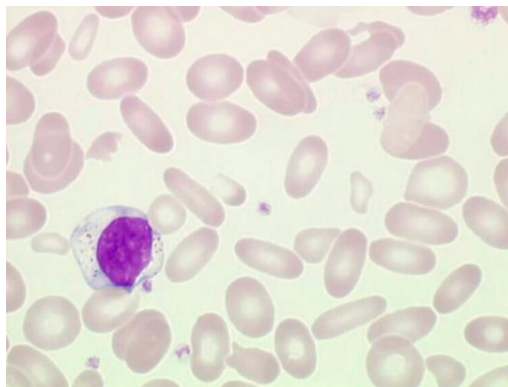


Figure 8 - Frottis sanguin d'un patient atteint d'elliptocytose héréditaire (4)

La forme sévère d'elliptocytose est la pyropoïkilocytose héréditaire. Celle-ci se traduit par une anémie hémolytique sévère associée à un ictère, une splénomégalie et des complications biliaires. Il peut exister des cellules hyperdenses et des microsphérocytes provoqués par fragmentation. Cette sous population est visible par un petit épaulement sur l'histogramme de distribution des volumes. De plus, la courbe d'ektacytométrie montre un profil anormale caractéristique en trapèze (33). En outre, le test à l'EMA (détaillé dans la partie suivante) indique une réduction de fluorescence plus basse que celles observées dans la sphérocytose héréditaire.

7.3. La stomatocytose héréditaire

La stomatocytose héréditaire est liée à des anomalies de perméabilité passive aux cations monovalents (Na^+ , K^+) de la membrane des globules rouges. Celles-ci sont responsables soit d'une hyperhydratation des cellules (hydrocytose), soit d'une déshydratation (xérocytose). Elle est caractérisée par la présence de stomatocytes au frottis (globule rouge en forme de bouche) (figure 9) (4). Ces stomatocytes sont parfois en très faible nombre voire conjoints aux sphérocytes ce qui rend le diagnostic difficile. La présentation clinique est semblable à celle de la sphérocytose héréditaire.

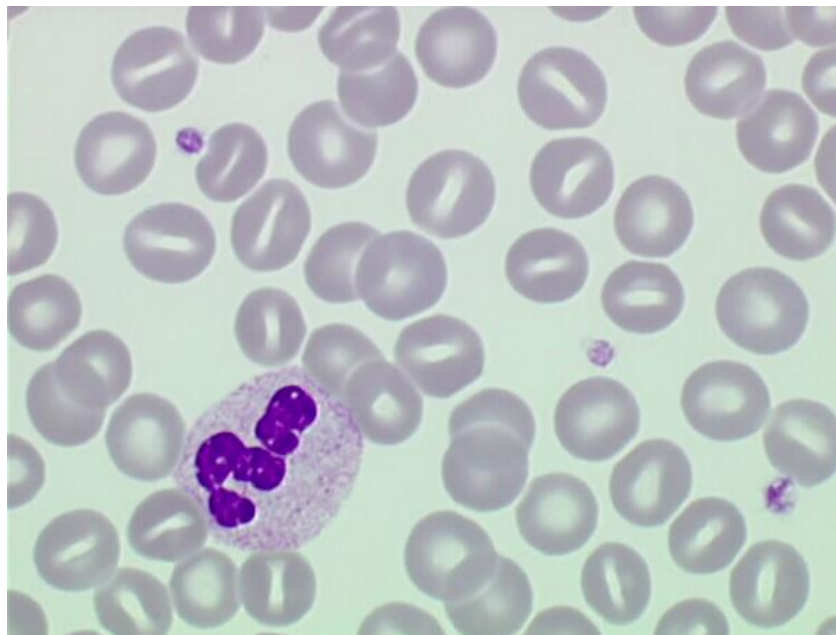


Figure 9 - Frottis sanguin d'un patient atteint de stomatocytose (4)

Le diagnostic repose sur le déplacement franc vers la droite de la courbe d'ektacytométrie en gradient d'osmolarité, rendant compte de globules rouges macrocytaires hyperhydratés et d'une résistance osmotique réduite pour la forme hyperhydratée. Pour la forme de xérocytose où il existe des cellules hyperdenses, la courbe sera déplacée vers la gauche (46).

7.4. L'ovalocytose du sud-est asiatique

Cette affection à transmission autosomique dominante s'étend de la Thaïlande à la Mélanésie. Elle se caractérise par la présence de stomato-ovalocytes sur le frottis dont certains sont particuliers avec une « double bouche » qui est quasi spécifique de l'ovalocytose du sud-est asiatique (figure 10) (4). Une perte totale de déformabilité à l'ektacytométrie (délétion de la protéine bande 3) est à noter. Le test EMA est perturbé avec une perte significative de fluorescence de la protéine bande 3.

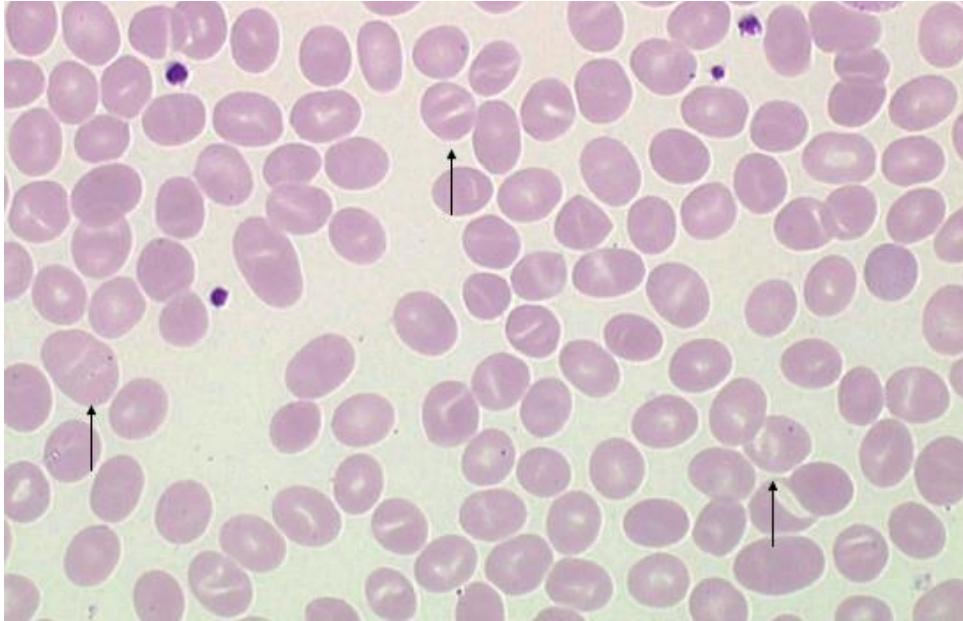


Figure 10 - Frottis sanguin d'un patient atteint d'ovalocytose héréditaire avec présence de stomato-ovalocytes en « double bouche » (flèches noires) (4)

7.5. La dysérythropoïèse congénitale de type II

La dysérythropoïèse congénitale de type II est une maladie constitutionnelle très rare de transmission autosomique récessive liée à une mutation d'un gène régulant la prolifération, la division et la maturation des érythroblastes. Les manifestations cliniques sont très proches de la sphérocytose héréditaire : anémie hémolytique chronique, splénomégalie, fragilité osmotique augmentée et présence de microsphérocytes. Cette pathologie est mise en évidence par la présence au frottis sanguin et au myélogramme d'érythroblastes binucléés (figure 11) (47). L'électrophorèse des protéines de la membrane érythrocytaire montre un aspect pincé de la protéine bande 3 et la présence de protéines du réticulum endoplasmique.

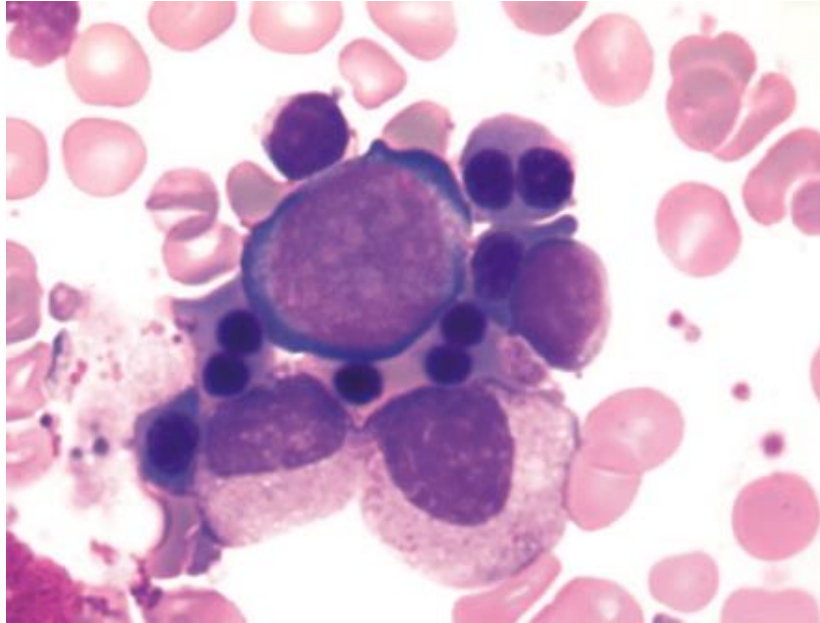


Figure 11 - Bi nucléation des érythroblastes au myélogramme d'un patient atteint de dysérythropoïèse congénitale de type II (47)

PARTIE 2 : ETAT DES LIEUX DES STRATEGIES DIAGNOSTIQUES DE LA SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE ET RECOMMANDATIONS ACTUELLES

1. Diagnostic biologique de la sphérocytose héréditaire

1.1. Hémogramme

Le diagnostic de sphérocytose héréditaire repose sur un faisceau d'arguments à savoir :

- Les antécédents familiaux
- Les signes cliniques inconstants dus à l'anémie : ictère, splénomégalie, pâleur, asthénie
- Une anémie microcytaire hyperdense et hémolytique régénérative
- La présence de sphérocytes sur le frottis sanguin et la diminution de la résistance osmotique.
- Test de Coombs érythrocytaire direct négatif

L'anémie est absente dans 40 % des cas car elle est compensée par la régénération médullaire sinon elle est le plus souvent modérée (9 à 12 g/dL). Cinq à dix pourcents des patients présentent une anémie sévère nécessitant une thérapeutique active (transfusions, recours plus fréquent à la splénectomie). La lignée plaquettaire peut être augmentée en cas d'hyper hémolyse mais dans la plupart des cas elle est normale tout comme la lignée leucocytaire. Concernant les indices érythrocytaires, le volume globulaire moyen (VGM) est normal ou parfois augmenté (dans les crises avec forte réticulocytose) ou parfois diminué par excès de microcytes. La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) est élevée dans plus de la moitié des cas, qui traduit la présence de globules rouges hyperdenses et déshydratés. Les réticulocytes sont augmentés mais reviennent à une valeur normale après splénectomie. La fraction immature des réticulocytes est faible sur les analyseurs Sysmex. Une hypocholestérolémie liée à l'augmentation de l'utilisation du cholestérol pour la composition des membranes peut être observée. Les stigmates biologiques classiques d'hémolyse sont retrouvés : augmentation de la bilirubine non conjuguée associée à un effondrement de l'haptoglobine et une augmentation des lactico-déshydrogénases.

Avant de poser le diagnostic de sphérocytose héréditaire, les autres causes d'anémie hémolytique doivent être éliminées, en particulier les anémies hémolytiques auto-immunes à auto-anticorps chauds (IgG) ou froids (IgM). Un test de Coombs direct est donc indispensable.

La figure 12 (23) suivante récapitule les données moléculaires et biologiques de la sphérocytose héréditaire :

Sévérité et fréquence	Mineures 30%	Modérées 60-70%	Modérément sévères 10%	Sévères 3-5%
Hb	N	> 8 g/dl	6 – 8 g/dl	< 6 g/dl
Réticulocytes	< 6 %	> 6 %	> 10 %	
Bilirubine	17 - 34 µmol/l	34-51 µmol/l		> 51 µmol/l
Frottis sanguin	Sphérocytes			Microsphérocytes et poikilocytose
Transfusions	0-1	2	>2	Dépendance transfusionnelle
Transmission	AD	AD, de novo		AR
Ankyrine				
β-spectrine				α-spectrine
Bande 3 formes hétérozygotes			formes homozygotes	
<small>D'après S. Perotta, Lancet 2008</small>				

Figure 12 - Données moléculaires et biologiques de la sphérocytose héréditaire (23)

1.2. Frottis sanguin

La morphologie des globules rouges sur frottis sanguin coloré au May Grünwald Giemsa est caractérisée par une déformation sphérique des globules rouges. Il s'agit de sphérocytes (figure 13) (4). Ils sont occasionnels ou seulement présents pendant la crise hémolytique. Néanmoins, cette anomalie morphologique n'est pas pathognomonique de la sphérocytose héréditaire. Les sphérocytes sont retrouvés dans les anémies hémolytiques auto-immunes à anticorps chauds, parfois à anticorps froids et dans les anémies allo-immunes comme la maladie hémolytique du nouveau-né. Ils sont donc retrouvés dans toutes les situations hémolytiques.

Ce sont des hématies de petit diamètre, rondes, très denses et ayant perdu leur halo clair central. Les sphérocytes représentent 5 à 10 % du total des globules rouges.

Une polychromatophilie est possible en raison d'un nombre élevé de réticulocytes. Dans les déficits en ankyrine, il n'y a que des sphérocytes. Alors que dans les déficits en bande 3 avant splénectomie, des sphérocytes dits « en champignon » ou globules rouges « pincés » (figure 13) (23) sont mis en évidence. Il s'agit d'un bourgeonnement, avec étranglement à un pôle de la cellule évoquant cette variété de sphérocytose héréditaire.

Des sphéroacantocytes sont visibles dans les déficits en spectrine β , et leur nombre augmente après splénectomie (figure 13) (23). Dans les formes avec spectrine β tronquée, on peut observer des elliptocytes sphérocytaires. Parfois, dans le déficit en protéine 4.2, des sphérostomatocytes (un peu ovalaires) sont retrouvés. On ne retrouve pas de corps de Howell Jolly au diagnostic, Ceux-ci sont en effet présents que secondairement, quelques mois après splénectomie totale (dans les splénectomies subtotaux ils peuvent être absents). Enfin, les érythroblastes circulants sont absents sauf dans les formes sévères (où la stimulation médullaire est importante).

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

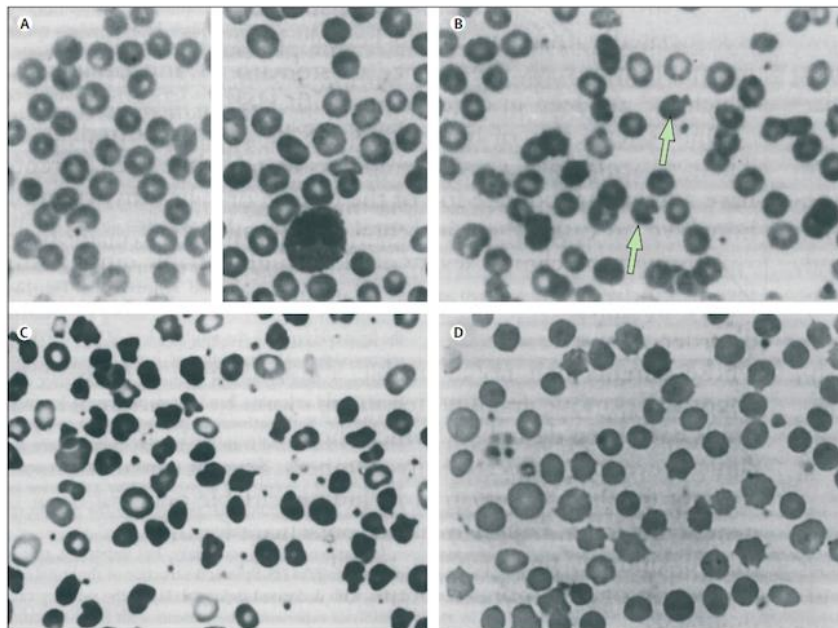


Figure 13 - Frottis sanguin chez des patients atteints de sphérocytose héréditaire dus à des déficits de la membrane différent (23)

(A) : Deux frottis sanguins de sphérocytose modérément sévère typique avec une carence légère en spectrine et en ankyrine-1. Bien que de nombreuses cellules aient une forme sphéroïdale, certaines conservent une concavité centrale.

(B) : Sphérocytose héréditaire avec des globules rouges « en champignon » dû au déficit en protéine bande 3.

(C) : Sphérocytose héréditaire atypique sévère dû à une déficience combinée grave de spectrine et d'ankyrine-1. En plus des sphérocytes, de nombreuses cellules ont des contours irréguliers.

(D) : Sphérocytose héréditaire avec une déficience en spectrine isolée due à une mutation de la β -spectrine. Certains sphérocytes ont des projections de surface proéminentes ressemblant à des sphéroacanthocytes.

Le myélogramme n'est réalisé qu'en cas de suspicion de crise d'érythroblastopénie aiguë (cf partie 1 : 6.3).

1.3. Tests utilisés pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire

Les examens biologiques utilisés pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire sont les suivants :

- L'ektacytométrie en gradient osmolaire
- Les tests d'hémolyse ou étude de la fragilité osmotique des hématies
- La cytométrie en flux
- L'électrophorèse des protéines membranaires
- La recherche de mutation

1.3.1. Ektacytométrie en gradient osmolaire

Le gold standard pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire est l'ektacytométrie. Cette technique très performante et très sensible ne se fait néanmoins que dans deux laboratoires français de l'assistance publique des hôpitaux de Paris (hôpitaux Bicêtre et Robert Debré) qui dispose de l'ektacytomètre.

Il s'agit de la technique la plus fiable qui étudie la déformabilité des globules rouges en fonction de l'osmolarité du milieu (33). Cet examen de référence utilise un ektacytomètre, appareil qui mesure l'indice de déformabilité des globules rouges soumis à des forces de cisaillement constantes générées par un viscosimètre de Couette. Parallèlement, l'osmolarité du milieu varie en continu. Les érythrocytes passent devant un rayon laser et vont diffracter la lumière. Ce signal lumineux traduit en index de déformabilité quantifie l'étirement du globule rouge (48). Nous obtenons un graphique avec en ordonnée l'index de déformabilité et en abscisse l'osmolarité du milieu de suspension. La courbe comporte trois paramètres informatifs :

- Le point « hypo » ou « O min » qui correspond à l'osmolarité en milieu hypoosmolaire. Les hématies prennent alors une forme sphérique et la déformabilité est nulle. Ce point traduit le rapport surface/volume.
- L'index de déformabilité maximale (ID max) qui est dépendant de la surface cellulaire.
- Le point « hyper » ou « O' » correspond à l'osmolarité en milieu hyperosmolaire. La déformabilité des hématies est égale à la moitié de l'ID max. Ce point est corrélé à l'état de déshydratation cellulaire et donc à la CCMH.

La figure 14 ci-dessous compare un patient atteint de sphérocytose avec un sujet sain. Une diminution de l'ID max et un point O min dévié vers la droite sont visibles le plus souvent. En effet, ce point qui correspond à l'osmolarité pour laquelle 50 % des hématies sont hémolysées dans le test de fragilité osmotique, témoigne de la diminution du rapport surface/volume. Un point hypo-osmolaire dans les valeurs normales n'exclut pas une sphérocytose héréditaire. Le point « hyper » ou « O' » est déporté vers la gauche le plus souvent traduisant ainsi la déshydratation cellulaire.

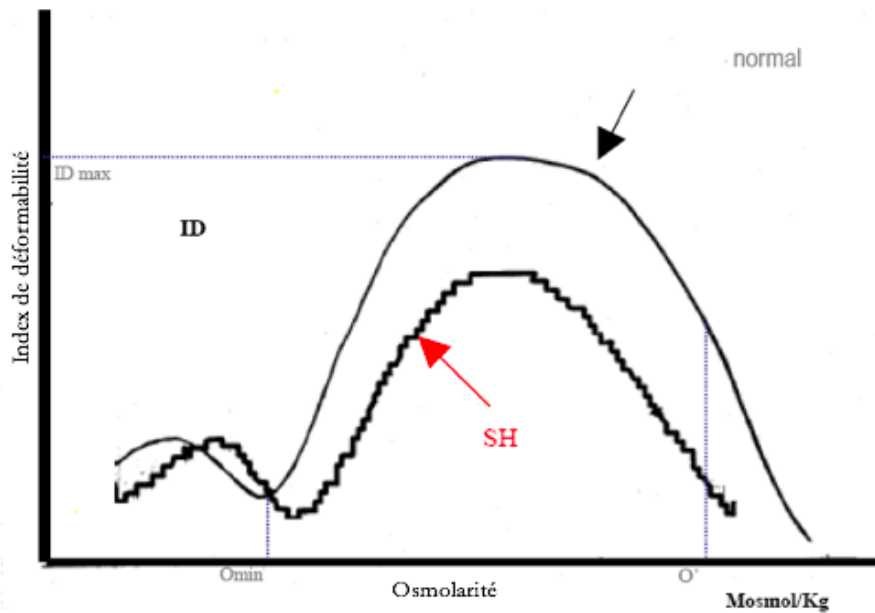


Figure 14 - Ektacytométrie en gradient osmolaire chez un sujet atteint de sphérocytose et chez un sujet sain

Chez 4 patients atteints de sphérocytose (figure 15) (49), on constate que l'ID max est plus bas que la normale. O min est normal chez les patients 1 et 2 et augmenté chez les patients 3 et 4. O' est diminué chez trois patients (1, 2 et 4), traduisant une déshydratation cellulaire dans ces 3 échantillons. Le patient 2 présente une déshydratation très importante (O' décalé vers la gauche) ce qui compense la perte de surface et se traduit par un O min normal.

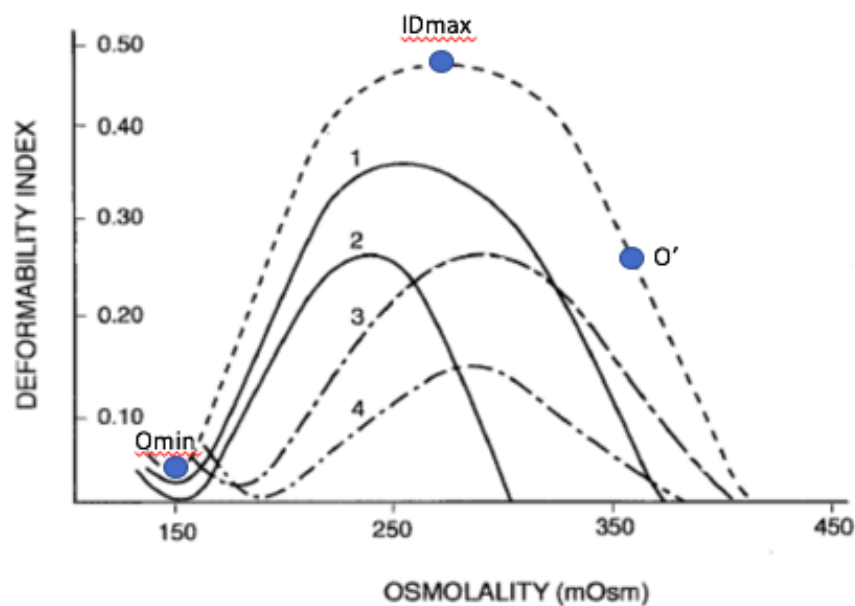


Figure 15 - Ektacytométrie en gradient osmolaire chez 4 patients atteints de sphérocytose héréditaire (49)

Cette technique permet de faire le diagnostic de sphérocytose héréditaire dans la majorité des cas mais peut être mis en défaut dans les formes frustes ou peu expressives. Elle permet de distinguer la sphérocytose héréditaire des autres anomalies constitutionnelles de membrane (elliptocytose héréditaire, pyropoïkylocytose héréditaire et les deux formes de stomatocytose héréditaire).

1.3.2. Test de fragilité osmotique des hématies

La fragilité osmotique du globule rouge est augmentée en raison d'une diminution de la surface membranaire par rapport à son volume. La fragilité osmotique est évaluable par plusieurs tests. Tous ces tests d'hémolyse peuvent être positifs dans d'autres anomalies membranaires : les anémies hémolytiques auto-immunes, les formes sévères d'elliptocytose héréditaire (pyropoïkilocytoses héréditaires), dans certaines dysérythropoïèses congénitales de type II (CDA II) mais cela uniquement pour les tests dépendant du rapport surface/volume.

Les tests sont les suivants :

a) Résistance globulaire osmotique

Ce test est appelé test de Dacie, improprement, puisqu'il a été développé par Parpart en 1947 et plus tard amélioré par Dacie. Il est le reflet de la capacité du globule rouge à se gorger d'eau dans un milieu hypotonique avant rupture membranaire et libération d'hémoglobine dans le milieu. Le paramètre étudié par ce test est le rapport surface/volume. Lorsque ce rapport est diminué comme dans la sphérocytose héréditaire, les hématies lysent à des osmolarités moins basses que des hématies saines : la résistance aux solutions hypotoniques est diminuée (ou leur fragilité osmotique est augmentée).

Cette technique fastidieuse à mettre en œuvre utilise plusieurs tubes formant une gamme de différentes concentrations en chlorure de sodium (NaCl). Après ajout d'un volume d'échantillon sanguin identique dans chaque tube et par mesure spectrophotométrique, l'hémoglobine libérée dans le surnageant après centrifugation est déterminée. L'hémoglobine libérée sera proportionnelle à la lyse. On réalise une mesure avant et une mesure après incubation à 37°C pendant 24 heures. Pendant l'incubation, les globules rouges continuent à métaboliser du glucose afin de produire l'énergie nécessaire au maintien de leur forme et taille. Ces conditions augmentent la fragilité osmotique des sphérocytes. Durant la période d'incubation, les hématies pathologiques meurent ainsi plus rapidement que les cellules normales. De plus, leur volume augmente en raison d'une hydratation cellulaire. Ces deux phénomènes associés expliquent la susceptibilité des sphérocytes à la lyse osmotique en comparaison aux cellules normales (49).

Cette mesure du pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration en NaCl sera comparée à un échantillon contrôle (figure 16) (50).

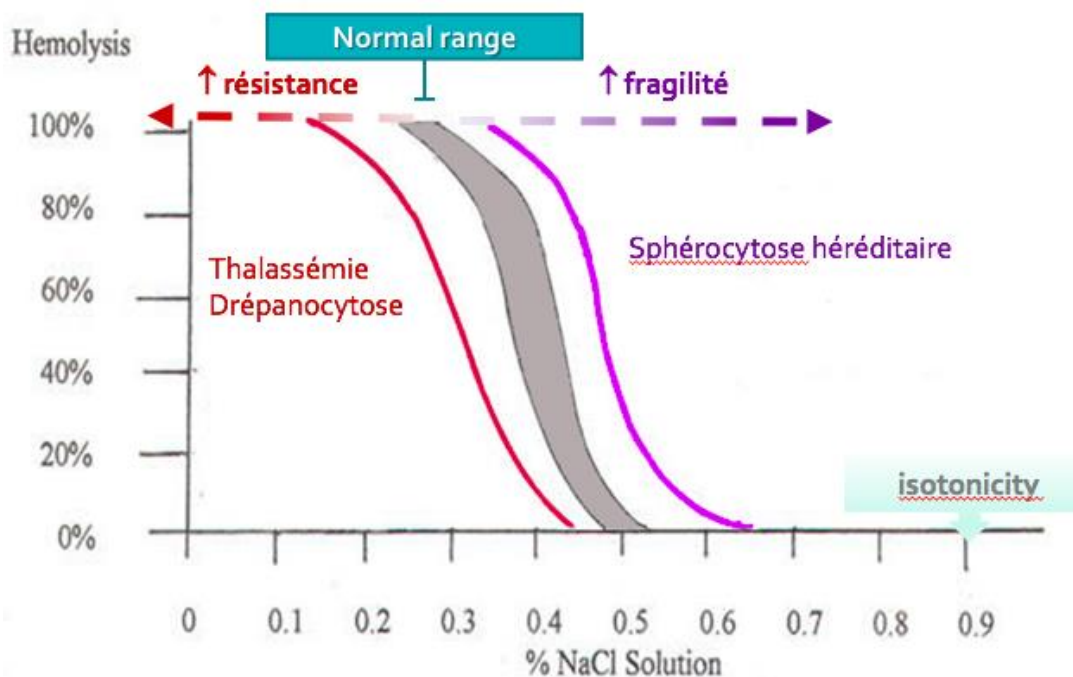


Figure 16 - Graphique représentant le pourcentage d'hémolyse en fonction de l'osmolarité du milieu (50)

- Si la courbe est déplacée vers la gauche, les hématies sont plus résistantes à l'hypotonie comme dans la thalassémie ou la drépanocytose.
- Si la courbe est déplacée vers la droite, les hématies sont plus fragiles et lysent à des concentrations plus proches de l'isotonie comme dans la sphérocytose héréditaire.

Ce test a longtemps été le test de première intention pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire, alors que sa sensibilité (70 %) et sa spécificité (71 %) sont faibles. Il ne permet donc pas d'éliminer une sphérocytose. En effet, la résistance globulaire osmotique donne des faux positifs dans les anémies hémolytiques d'origine immune et chez les patients atteints d'elliptocytose héréditaire. La fragilité osmotique repose sur 2 paramètres : la surface cellulaire et son volume. Une perte de surface membranaire peut être contrebalancée par une diminution du volume : le rapport surface/volume restera normal et n'indira donc pas de fragilité osmotique supplémentaire (49).

b) Test d'auto hémolyse 48h à 37°C

Il est très sensible mais peu spécifique. Il est donc très peu utilisé en routine. Il consiste à laisser 48h du sang défibriné à 37°C. L'hémolyse spontanée pour un patient sain est inférieure à respectivement 5 % et 1 % sans et avec glucose. Dans la sphérocytose héréditaire, elle est très augmentée (5 à 20 %) et partiellement corrigée par l'addition de glucose ou d'ATP nécessaire pour le besoin énergétique accru des globules rouges pathologiques (alors que dans les anémies hémolytiques auto-immunes, il n'y a pas de correction). Un résultat dans les valeurs normales n'exclut cependant pas le diagnostic de sphérocytose héréditaire (51).

c) Test de cryohémolyse

Ce test consiste à placer dans un milieu hypertonique les globules rouges en réalisant un changement brutal de température. Ces derniers vont ainsi subir un choc thermique (de 37°C à 0°C) pour induire une puissante hémolyse. Les sphérocytes (quel que soit le déficit membranaire) sont plus susceptibles à la cryohémolyse que les érythrocytes sains. Cette technique dépend de la propriété de la membrane érythrocytaire et non pas du rapport surface/volume comme la plupart des autres tests (52). La densité optique à 540 nm après dix minutes d'incubation à 0°C et la densité optique qui correspond à 100 % d'hémolyse sont mesurées. Ce ratio de cryohémolyse est compris entre 3 et 15 % pour un sujet sain. Tandis qu'il est supérieur à 20 % pour un sujet atteint de sphérocytose héréditaire. Ce test a une sensibilité de 100 % et une spécificité de 90 % (53). Il est peu coûteux et simple à réaliser. Un faible volume sanguin est nécessaire (200 à 500 µL) ce qui le rend accessible aux nouveau-nés. Contrairement à la résistance osmotique qui est diminuée chez les nouveau-nés, il n'y a aucune influence de l'âge sur la cryohémolyse. L'étude de Romero et coll. (54) montre des pourcentages de cryohémolyse normaux en cas d'hémolyse mécanique (prothèses cardiaques valvulaires mécaniques).

d) Test de lyse au glycérol acidifié ou acidified glycerol lysis test (AGLT)

Ce test utilise un milieu hypotonique contenant du glycérol qui ralentit l'entrée d'eau dans la cellule et donc le gonflement des hématies. Le temps de lyse glycérolé est raccourci pour les patients atteints de sphérocytose héréditaire car le ratio surface/volume est diminué. Le principe du test est basé sur la mesure de l'absorbance à 625 nm. Le temps nécessaire pour obtenir 50 % de l'hémolyse initiale (AGLT₅₀) est mesuré. Chez un sujet normal, AGLT₅₀ est obtenu après plus de 30 minutes. Tandis que dans la sphérocytose héréditaire, l'hémolyse est plus rapide : AGLT₅₀ est obtenu en 50 à 100 secondes. Cette technique est simple, rapide et peu coûteuse. La sensibilité de test de lyse au glycérol acidifié est de 81,6 % et la spécificité est de 100 %. Elle peut être réalisée jusqu'à 24 heures après le prélèvement sanguin (55). Néanmoins, la reproductibilité de ce test n'est pas très bonne en raison de l'instabilité du pH de la solution isotonique.

e) Pink test

Le pink test est un test de lyse au glycérol acidifié modifié. Il mesure l'hémolyse *via* l'absorbance d'un échantillon sanguin de faible volume (1 tube EDTA de 5mL) incubé dans une solution contenant du glycérol, de NaCl, du NaN₃ et du HCl. L'osmolarité est fixée à 290 +/- 5 mOsm et la solution est tamponnée à un pH de 6,66. Il s'agit d'incuber les globules rouges du témoin et les globules rouges du patient en présence de la solution avant de réaliser une centrifugation. La densité optique du surnageant est mesurée à 540 nm (1^{ère} absorbance). Une 2^{ème} mesure de l'absorbance est réalisée lorsque tous les globules rouges ont été lysés grâce au triton. Un rapport entre les deux valeurs d'absorbance est ensuite réalisé. Chez le sujet sain ce rapport est inférieur à 20 %.

Les résultats sont indépendants du pH de la solution (contrairement au test de lyse au glycérol acidifié) ce qui améliore la reproductibilité. La sensibilité du pink test est de 91 %. Ce test ainsi que son application au laboratoire du CHRU de Nancy sera détaillé dans la partie 3 ci-dessous.

1.3.3. Cytométrie en flux : test à l'EMA

La méthode de cytométrie en flux utilise un marquage des globules rouges avec l'éosine 5'maléimide (EMA) qui est un intercalent membranaire. L'EMA est une molécule fluorescente qui se lie à la protéine bande 3 du globule rouge. Cette liaison est responsable d'environ 80 % de la fluorescence (56) (57). Le reste de la fluorescence est due à la liaison de l'EMA avec de groupements sulfhydriles du complexe Rh (CD47, RhAG3 et le polypeptide Rhésus). Une diminution de ces molécules a été montrée dans la sphérocytose héréditaire. Même si l'EMA n'interagit pas directement avec la spectrine, l'ankyrine et la protéine 4.2, trois molécules aussi en cause dans la sphérocytose, la liaison de l'EMA au CD47, au polypeptide Rh et à la Rh AG est un reflet indirect mais fiable de la composition du cytosquelette (58). La capacité de fixation du colorant à des molécules spécifiques de la membrane cellulaire donne à ce test une grande spécificité. Ce test mesure l'intensité de la fluorescence des érythrocytes lavés et incubés avec l'EMA. Cette intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de molécules fixées et est comparée à celle des globules rouges témoins. Elle est exprimée en unités IMF (Intensité moyenne de fluorescence). La réduction de l'intensité de la fluorescence est calculée en pourcentage selon la formule suivante $(\text{IMF chez les témoins} - \text{IMF patient}) / \text{IMF des témoins} \times 100$. Les cymomètres en flux étant différents d'un laboratoire à l'autre, il est important que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs de référence.

L'interprétation des résultats se fait comme suit au CHRU de Nancy (59) :

- Baisse de la fluorescence de 0 % à 16 % (variation interindividuelle normale) : profil normal
- Baisse de la fluorescence de 16 % à 20 % (variation interindividuelle légèrement augmentée) : profil en « zone grise », diagnostic de sphérocytose héréditaire non exclue.
- Baisse de la fluorescence de plus de 20 % (variation interindividuelle anormalement augmentée) : profil anormal en faveur du diagnostic de sphérocytose héréditaire (figure 17) (60).

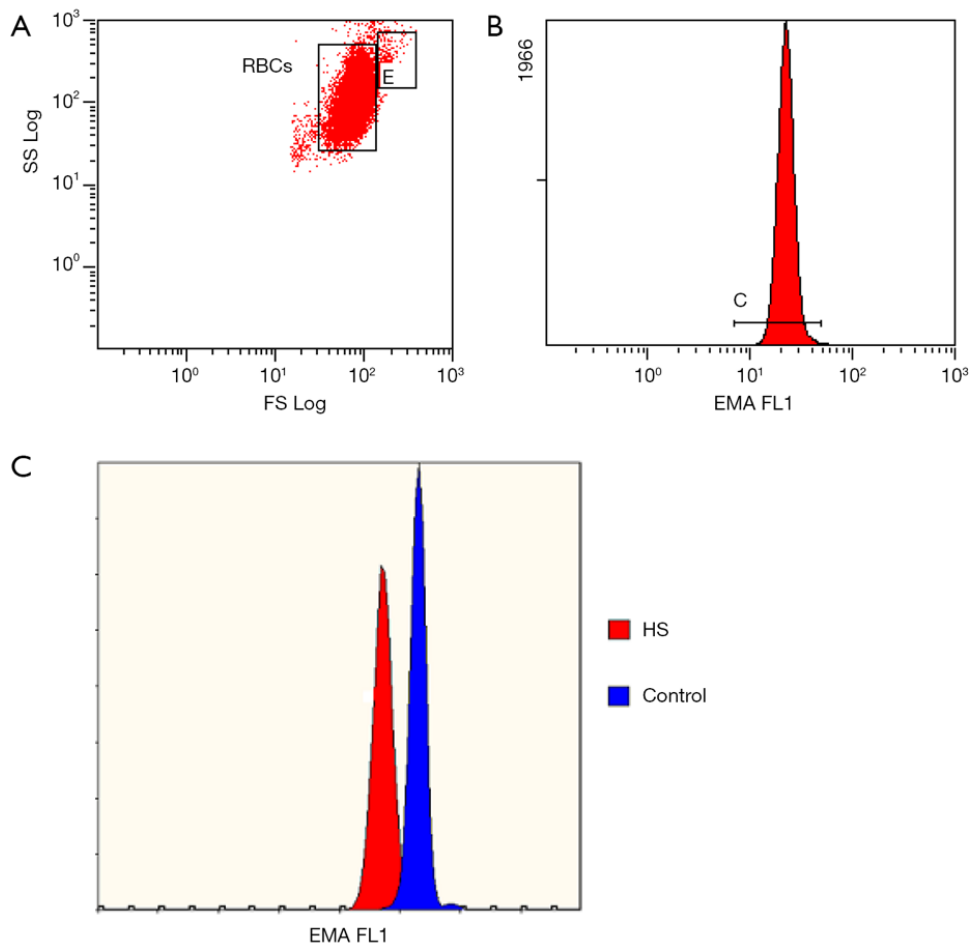


Figure 17 - Représentation graphique du test EMA (60)

A : Les globules rouges sont fenêtrés dans le champ « RBC » (le champ « E » contient des doublets d'érythrocytes). Nuages de points qui représentent l'image de la structure des cellules à 90° (SS) en fonction de l'image de la taille des cellules dans l'axe (FS) basé sur une échelle logarithmique. B : La fluorescence des cellules liées à l'EMA est mesurée dans le premier canal de fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et présentée sous forme d'intensité de fluorescence moyenne. C : Histogramme de fluorescence des globules rouges colorés à l'EMA du sujet atteint de sphérocytose héréditaire (premier pic inférieur rouge) et d'un contrôle sain (deuxième pic bleu). Les pics diffèrent par l'intensité moyenne de fluorescence.

L'analyse requiert un échantillon de sang de 5mL (EDTA ou héparinate de sodium) du patient et un témoin négatif (sujet sain du même sexe et d'âge proche, de VGM proche, non apparenté, prélevé sur le même anticoagulant).

Le test EMA est simple et assez rapide. Il demande une faible quantité de sang. Sa sensibilité est de 93 % et sa spécificité est de 98 % (61). Ce test a également l'avantage de pouvoir être différé sur plusieurs jours sans que les résultats ne soient impactés.

L'EMA peut être suivi d'une analyse d'image sur le logiciel IDEAS pour étudier des fonctionnalités telles que la circularité et le rapport de forme. Il s'agit de la cytométrie en flux d'imagerie à haut débit qui combine la vitesse, la sensibilité et les capacités de phénotypage de la cytométrie en flux avec des détails d'imagerie (62).

Elle permet d'examiner la morphologie et l'intensité du signal de fluorescence dans les membranopathies.

Les avantages de cette imagerie à haut débit par rapport à la cytométrie en flux standard est sa capacité à fournir une analyse d'image à haut contenu et mesurer des paramètres tels que la circularité et le rapport de forme permettent de distinguer les membranopathies érythrocytaires. La liaison au colorant EMA n'affecte pas la morphologie cellulaire des globules rouges. En outre, cette technique a la capacité de localiser les cellules dans lesquelles la liaison de l'EMA a eu lieu.

Le contraste caractéristique (présence ou l'absence de pâleur centrale) entre les cellules permet d'affirmer une sphérocytose héréditaire.

Dans les laboratoires d'hématologie équipés, ce test rapide et efficace permet la différenciation des pathologies de la membrane des globules rouges.

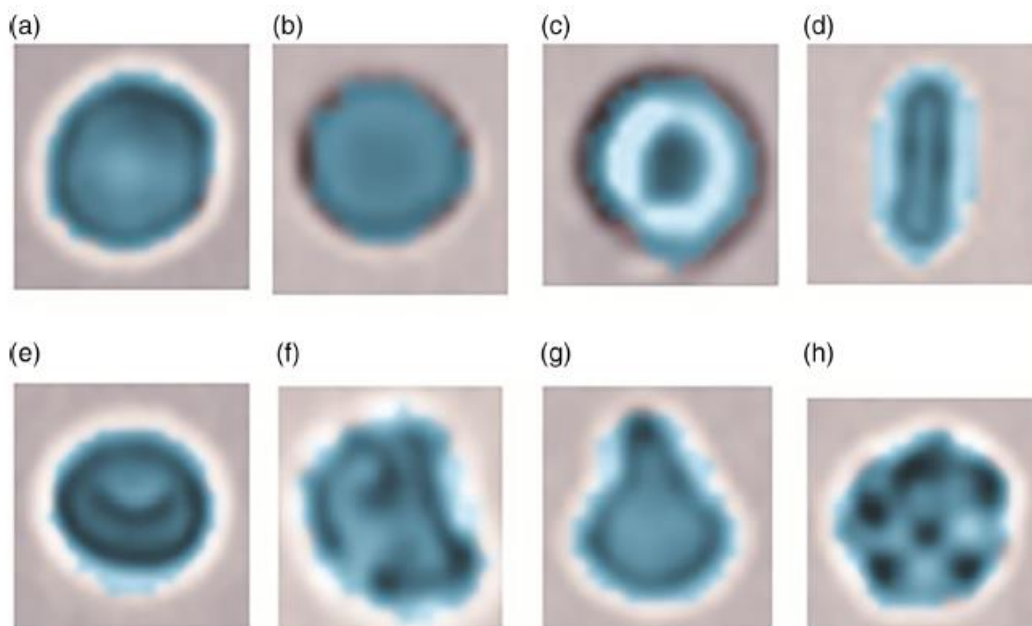


Figure 18 - Différents globules rouges capturés sur le logiciel IDEAS (62)

(a) globule rouge sain ; (b) sphérocyte ; (c) codocyte ou hématie cible ; (d) elliptocyte ; (e) stomatocyte ; (f) degmacyte ou « hématie mordue » ; (g) dacryocyte ; (h) sphéroéchinocyte.

Le tableau 6 suivant récapitule les examens biologiques à réaliser en première intention.

Tableau 6 - Récapitulatif des examens biologiques pour le dépistage de sphérocytose héréditaire

Tests	Principe	Volume et échantillon	Délai d'exécution du test	Performances : sensibilité/spécificité
Ektacytométrie en gradient osmolaire	Déformabilité des hématies	1 tube EDTA 5 mL	72 h	Gold standard : 2 laboratoires en France
Résistance osmotique	Test d'hémolyse	1 tube Hépariné 5 mL	24 - 48 h	66 % / 71 %
AGLT	Test d'hémolyse	1 tube EDTA 5 mL	> 3 h	81 % / > 95 %
Pink Test	Test d'hémolyse	1 tube EDTA 5 mL	< 3h	91 % / 79 à 94 %
Cytométrie en flux	Marquage des hématies à l'EMA	1 tube EDTA 5 mL	24 - 48 h	93 % / 98 %

1.3.4. Electrophorèse des protéines membranaires

Bien que les tests de dépistage de la sphérocytose héréditaire soient caractérisés par une sensibilité et une spécificité satisfaisante, ils n'indiquent pas quelle protéine de la membrane plasmique est déficiente ni quelle mutation génétique est responsable des symptômes observés. Le diagnostic final nécessite des méthodes plus spécifiques pour identifier le trouble réel. Pour détecter une déficience de la membrane plasmique, une électrophorèse des protéines de la membrane des globules rouges est effectuée. L'électrophorèse sur gel de dodécyl sulfate de sodium et de polyacrylamide (SDS-PAGE) permet de détecter une anomalie quantitative ou qualitative en protéines de la membrane plasmique (22).

L'inconvénient du SDS-PAGE est le volume d'échantillon nécessaire à l'analyse. Cette méthode laborieuse et chronophage nécessite une préparation des hématies notamment l'élimination de l'hémoglobine des membranes plasmiques (63). De plus, cette technique n'est disponible uniquement dans les centres de diagnostic hautement spécialisés contrairement au test EMA ou à l'évaluation de la fragilité osmotique qui est beaucoup plus répandue (64).

En cas de mutation au sein du gène de l'ankyrine, l'interprétation de SDS-PAGE pourrait être difficile car elle se présente comme une bande mince située directement sous la bande de spectrine (65). En outre, l'électrophorèse doit être interprétée en fonction du taux de réticulocytes car ces derniers sont riches en ankyrine dont le déficit est le plus retrouvé dans la sphérocytose (33). Le SDS-PAGE classique est une méthode unidimensionnelle qui, dans 10 à 20 % des cas, ne permet pas de détecter la protéine de la membrane plasmique déficiente. Une méthode améliorée, l'électrophorèse bidimensionnelle (2D) des protéines de la membrane

plasmique des globules rouges, a été introduite pour augmenter la sensibilité de la méthode appliquée. Dans cette technique 2D, les protéines sont séparées non seulement en fonction de leur poids moléculaire, mais aussi en fonction de la charge (60). Les protéines membranaires sont étudiées selon les techniques de Fairbanks (séparant mieux les protéines de plus haut poids moléculaire) ou de Laemmli (séparant mieux les protéines légères) (figure 19) (12).

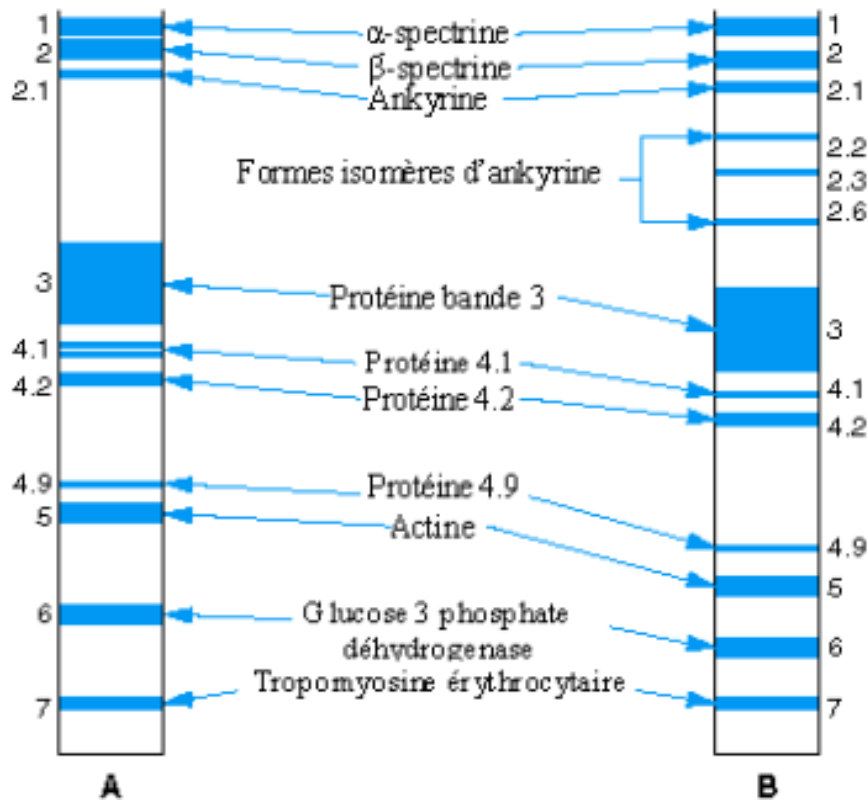


Figure 19 - Représentation schématique d'électrophorèses SDS-PAGE (12)

- A. Technique de Laemmli
- B. Technique de Fairbanks

1.3.5. Recherche des mutations

Le diagnostic moléculaire permet d'identifier la mutation génétique au sein des gènes codant pour les protéines de la membrane plasmique. Les défauts génétiques confirmés à l'origine de la maladie incluent le gène SPTA1 codant pour la spectrine α , le gène SPTB codant pour la β -spectrine, le gène ANK1 codant pour l'ankyrine, le gène SLC4A1 codant pour la protéine de bande 3 et / ou le gène EPB42 codant pour la protéine 4.2. Le diagnostic moléculaire est la méthode la plus avancée et la plus coûteuse, et est généralement la dernière option, en particulier chez les sujets qui présentent des symptômes (ou si forme sévère avec transfusions très régulières empêchant l'interprétation des tests précédents), lorsque les méthodes mentionnées précédemment n'aboutissent pas à un diagnostic direct. La présence d'une mutation génétique ne déterminant pas la gravité de la maladie ni son évolution, il n'est pas nécessaire d'obtenir des informations précises concernant la mutation génétique

spécifique. Le diagnostic moléculaire est utilisé pour faire la distinction entre un polymorphisme et une mutation génétique. De plus, cela peut aider à prédire l'évolution de la maladie si des polymorphismes préjudiciables sont présents (22). Pendant de nombreuses années, des mutations géniques ont été détectées par réaction en chaîne par polymérase. Actuellement, les méthodes appliquées sont plus avancées, permettant le dépistage des mutations génétiques sur des quantités illimitées d'ADN. Le séquençage du génome entier permet l'identification de nouvelles mutations qui causent la sphérocytose héréditaire. Les progrès du diagnostic moléculaire, du séquençage de Sanger au séquençage de nouvelle génération (NGS) et au séquençage de l'exome entier, permettent la découverte de nouvelles mutations et permettent un diagnostic final de sphérocytose héréditaire dans les cas non résolus avec la coexistence de deux maladies différentes (60). L'indication d'une étude moléculaire est exceptionnelle et réservée au conseil génétique dans des cas de sphérocytose héréditaire très sévère.

2. Recommandations actuelles pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire

Selon les recommandations de 2012 de la société allemande, pour le diagnostic et le traitement des maladies hématologiques et oncologiques, il n'existe pas de test unique qui détecte toutes les formes de sphérocytose héréditaire, c'est pourquoi il est recommandé d'utiliser au moins deux méthodes différentes, de préférence le test EMA et un test de lyse au glycérol. Ces recommandations non gradées se basent sur l'unique étude de Bianchi *et al.* (61).

D'autres recommandations pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire sont celles du British Society of Haematology de 2011 (66) :

1. Les patients récemment diagnostiqués avec une histoire familiale de sphérocytose héréditaire, des signes cliniques évidents ainsi que des signes biologiques en faveur d'une sphérocytose (sphérocytes au frottis sanguin, CCMH et réticulocytes augmentés) ne nécessitent pas d'examens supplémentaires (recommandation de grade 1, niveau de preuve A)

2. Si le diagnostic est ambigu (quelques sphérocytes sur le frottis sanguin, absence d'antécédent familial et absence des signes cliniques et biologiques) un test de dépistage à haute valeur prédictive est utile. Les tests de dépistage recommandés sont : le test de cryohémolyse ou l'EMA (recommandation de grade 1, niveau de preuve A). La valeur prédictive des deux techniques peut être améliorée lorsque les résultats sont examinés parallèlement avec l'information clinique, l'histoire familiale et les indices érythrocytaires. Si l'interprétation des résultats est encore équivoque, une étude familiale devra être effectuée afin de déterminer la tendance.

3. Le diagnostic de confirmation pourra être nécessaire si les résultats des tests de dépistage sont limités ou douteux. L'électrophorèse des protéines membranaires est la méthode de choix (recommandation de grade 1, niveau de preuve B). Le principal inconvénient de ce test est le manque de la sensibilité pour les formes minimales ou asymptomatiques. L'électrophorèse est recommandée lorsque :

- a) Le phénotype clinique est plus sévère que celui prédit par la morphologie des hématies au frottis.
- b) La morphologie des hématies est plus sévère que celle prédite par le frottis des parents lorsque l'un des parents est connu atteint de la maladie.
- c) Le diagnostic n'est pas clair avant la splénectomie ou quand un patient a une anomalie de la perméabilité de la pompe Na^+/K^+ (trouvée également dans la stomacytose héréditaire). Cet examen est indiqué dans les formes atypiques de sphérocytose avec anémie macrocytaire, ou avec des formes associées à une autre pathologie érythrocytaire pouvant cacher certains signes biologiques (33).

4. L'étude moléculaire n'est pas requise pour le diagnostic.

Les grades et qualités des recommandations sont présentés en annexe 1.

Le guide britannique recommande le test de cryohémolyse et l'EMA pour confirmer un cas de sphérocytose héréditaire lorsque le diagnostic clinique n'est pas concluant. Toutefois, une étude publiée en 2013 de Park *et al.*, met en doute la performance de la cryohémolyse et conclut que, malgré la recommandation de ce guide, les meilleurs tests de diagnostic sont l'EMA et les tests de fragilité osmotique (67).

Dans des cas exceptionnels, après ces deux tests, les auteurs recommandent le recours à l'ektacytométrie, à l'analyse protéinique ou génétique.

Les recommandations disponibles sont unanimes sur le fait qu'au moins deux différents tests de laboratoire doivent être utilisés lorsque le diagnostic clinique de la sphérocytose héréditaire (antécédents familiaux, symptomatologie typique) et les tests de laboratoire habituels ne sont pas concluants. L'EMA est une méthode fiable. Le choix des autres méthodes qui pourraient être utilisées en association avec l'EMA n'est pas établi et les opinions divergent. En effet, la combinaison de tests augmente les performances diagnostiques (sensibilité et spécificité) et optimise le diagnostic.

Les tests d'hémolyse (test de résistance globulaire osmotique, pink test, AGLT) sont peu coûteux et permettent de faire le diagnostic dans la majorité des cas. Le pink test, a une sensibilité de 95 % et une spécificité de 91 % dans le diagnostic de la sphérocytose héréditaire (61).

Ainsi chez les patients pour lesquels le diagnostic de sphérocytose héréditaire peut être établi à partir de l'histoire clinique et familiale, de l'examen clinique, des indices érythrocytaires, de la présence de sphérocytes sur le frottis sanguin et de l'étude de la résistance globulaire osmotique avant et après incubation, il n'est pas nécessaire d'effectuer une exploration par ektacytométrie. Cynober et coll. (49) proposent la stratégie suivante si la résistance globulaire osmotique est normale en cas de suspicion de sphérocytose héréditaire :

- Une CCMH normale associée à une résistance globulaire osmotique normale permet d'exclure le diagnostic de sphérocytose héréditaire.
- Une CCMH augmentée et/ou un pourcentage de cellules hyperdenses augmenté doit faire évoquer le diagnostic de sphérocytose héréditaire : l'ektacytométrie doit alors être réalisée.

L'association de deux tests tels que l'EMA et un test d'hémolyse en milieu glycérolé (pink test) permettent, ensemble, de se passer de l'ektacytométrie dans la majorité des cas comme l'indique le tableau 7 suivant avec une sensibilité de 99 % (61) d'où l'intérêt de ce travail.

De plus, l'EMA seul ne suffit pas toujours à conclure à un diagnostic : un test EMA normal ne peut exclure complètement une sphérocytose héréditaire (68).

Tableau 7 - A : Sensibilité des tests chez des patients atteints de sphérocytose héréditaire en fonction du déficit biochimique. B : Sensibilité des tests combinés chez des patients atteints de sphérocytose héréditaire (61)

A						
	EMA-binding	GLT	AGLT	Pink	OF (NaCl fresh)	OF (NaCl inc.)
Total HS patients	140/150 (93%)	92/150 (61%)	143/150 (95%)	136/150 (91%)	102/150 (68%)	122/150 (81%)
HS with biochemical defect	132/141 (94%)	90/141 (64%)	135/141 (96%)	131/141 (93%)	100/141 (71%)	119/141 (84%)
Spectrin	68/73 (93%)	45/73 (61%)	70/73 (96%)	67/73 (92%)	51/73 (70%)	62/73 (85%)
Band 3	55/59 (93%)	38/59 (64%)	56/59 (93%)	55/59 (93%)	43/59 (73%)	49/59 (83%)
Combined spectrin/ankyrin	9/9 (100%)	7/9 (78%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	6/9 (67%)	8/9 (89%)
HS with undetectable defect	8/9 (88%)	2/9 (22%)	8/9 (88%)	2/9 (22%)	3/9 (33%)	4/9 (44%)

B					
	EMA + AGLT	EMA + OF (NaCl fresh)	EMA + OF (NaCl inc.)	EMA + Pink	OF (NaCl inc.) + AGLT
Total HS patients	150/150 (100%)	143/150 (95%)	143/150 (95%)	149/150 (99%)	146/150 (97%)

OF: osmotic fragility; Inc.: incubated.

Les chiffres représentent le ratio de cas positifs sur les cas totaux avec le pourcentage indiqué entre parenthèse.

OBJECTIF DE L'ETUDE

Au CHRU de Nancy, le diagnostic biologique de la sphérocytose héréditaire repose exclusivement sur l'EMA, en complément de l'hémogramme et du frottis. Le test EMA, bien qu'ayant des performances diagnostiques satisfaisantes pose quelques difficultés d'ordre technique et logistique (disponibilité du cytomètre, choix des témoins, préparation fastidieuse des échantillons). En termes d'interprétation, il existe une zone grise nécessitant le recours à l'ektacytométrie et donc un nouveau prélèvement.

Ainsi, ce travail s'intègre dans une démarche globale d'amélioration de la stratégie de réalisation des tests pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire, afin de :

- Lever certaines contraintes techniques liées à l'EMA
- Suivre les recommandations qui préconisent l'association des 2 tests (EMA et un test de fragilité osmotique)

Notre choix s'est porté sur le pink test au vu des données rapportées dans la littérature sur sa rapidité technique, sa fiabilité et la faible quantité nécessaire de sang pour réaliser l'analyse. En effet, une majorité des échantillons est issue de la pédiatrie.

PARTIE 3 : AMELIORATION DU PROTOCOLE EMA AU CHRU DE NANCY

La fiche technique et la procédure de l'EMA au CHRU de Nancy ont été améliorées (annexe 2 avant amélioration et annexe 3 après amélioration du protocole). L'EMA est une molécule fluorescente qui se lie à la protéine bande 3 du globule rouge. Après excitation par un laser, l'intensité de fluorescence obtenue est proportionnelle à la quantité de molécules fixées et est comparé à celle des globules rouges témoins. Le résultat est rendu en pourcentage de perte de fluorescence. Ce test est réalisé à l'aide du cytomètre BD FACSLyric™.

Cette technique nécessite de prévoir un ou plusieurs témoins présentant un hémogramme normal en tenant compte en priorité du VGM du patient à plus ou moins 2 fL(69) et idéalement également de la catégorie d'âge la plus proche (nouveau-né, enfant, adulte, sujet âgé). Si l'analyse est réalisée dans les 24 h suivant le prélèvement, un seul témoin suffit, correspondant au jour du prélèvement du patient. Si l'analyse est différée, il faut prévoir deux témoins : un du jour du prélèvement et un du jour de l'analyse.

Le protocole est fastidieux et chronophage (nombreux lavages : 3 lavages pré-marquage et 5 lavages post-marquage, travail en triplicate pour chaque témoin et chaque patient). La durée approximative de la technique est 2h30. Pour l'alléger et pour gagner du temps, nous avons identifié 3 points critiques potentiels de la procédure à optimiser (annexe 2) :

1. Nombre de lavages pré-marquage
2. Nombre de tubes à réaliser pour le patient et pour le témoin lors de l'incubation avec l'EMA
3. Nombre de lavages post-marquage

1. Évaluation de la réduction du nombre de lavages pré-marquage

Nous allons étudier l'impact du nombre de lavage pré-marquage sur la fluorescence finale qui traduit la qualité du marquage de l'EMA.

Nous avons testé 1, 2 ou 3 centrifugations pré-marquage. Nous avons travaillé sur 6 témoins et sur 7 patients. La figure 20 suivante montre un exemple de résultats obtenus pour 3 des patients et 2 des témoins.

Le coefficient de variation (CV) moyen obtenu pour les 7 patients est de 1,70 %. Le CV moyen pour les 6 témoins est de 0,93 %.

En conclusion, le CV est très faible quel que soit le niveau d'intensité de fluorescence. Il n'y a pas de différence sur la fluorescence finale entre les patients et les témoins donc un seul lavage par échantillon suffit (témoin ou patient).

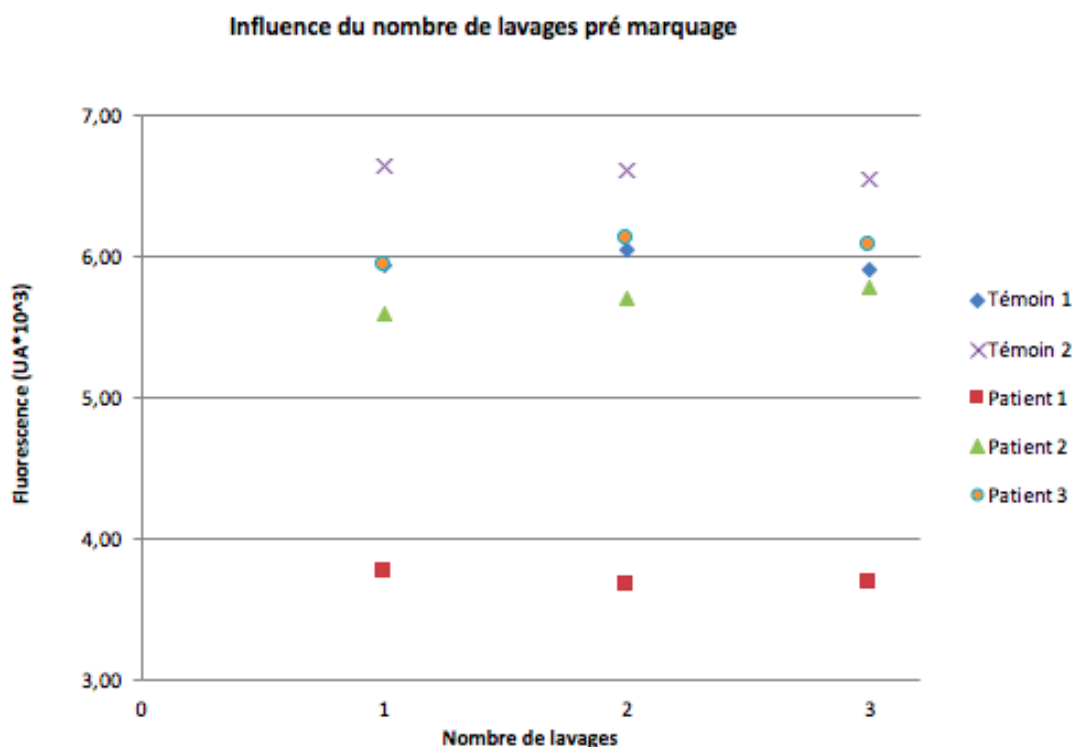


Figure 20 - Exemple de résultats représentant la fluorescence en fonction du nombre de lavages pour 2 témoins et 3 patients atteints de sphérocytose héréditaire

2. Évaluation de la réduction du nombre de tubes à faire pour le patient et pour le témoin lors de l'incubation avec l'EMA

Nous allons étudier l'impact du nombre de tubes à réaliser par patient et par témoin sur la fluorescence finale qui traduit la qualité du marquage de l'EMA.

Nous avons testé 1, 2 ou 3 tubes par patient et par témoin. Nous avons travaillé sur 20 patients et sur 20 témoins.

Le CV moyen obtenu pour les 20 patients est de 0,61 %. Le CV moyen pour les 20 témoins est de 0,58 %.

En conclusion, le CV est très faible quel que soit le niveau d'intensité de fluorescence. Il n'y a pas de différence sur la fluorescence finale entre les patients et les témoins donc un seul tube par échantillon suffit (témoin ou patient).

3. Évaluation de la réduction du nombre de lavages post-marquage

Nous allons étudier l'impact du nombre de lavage post-marquage sur la fluorescence finale qui traduit la qualité du marquage de l'EMA.

Nous avons testé 3, 4 ou 5 centrifugations post-marquage. Nous avons travaillé sur 7 témoins et sur 7 patients. La figure 21 montre un exemple de résultats obtenus pour 3 des témoins et 2 des patients.

Le CV moyen obtenu pour les 7 patients est de 0,69 %. Le CV moyen pour les 7 témoins est de 0,51 %.

En conclusion, le CV est très faible quel que soit le niveau d'intensité de fluorescence. Il n'y a pas de différence sur la fluorescence finale entre les patients et les témoins donc trois centrifugations finales par échantillon suffisent (témoin ou patient).

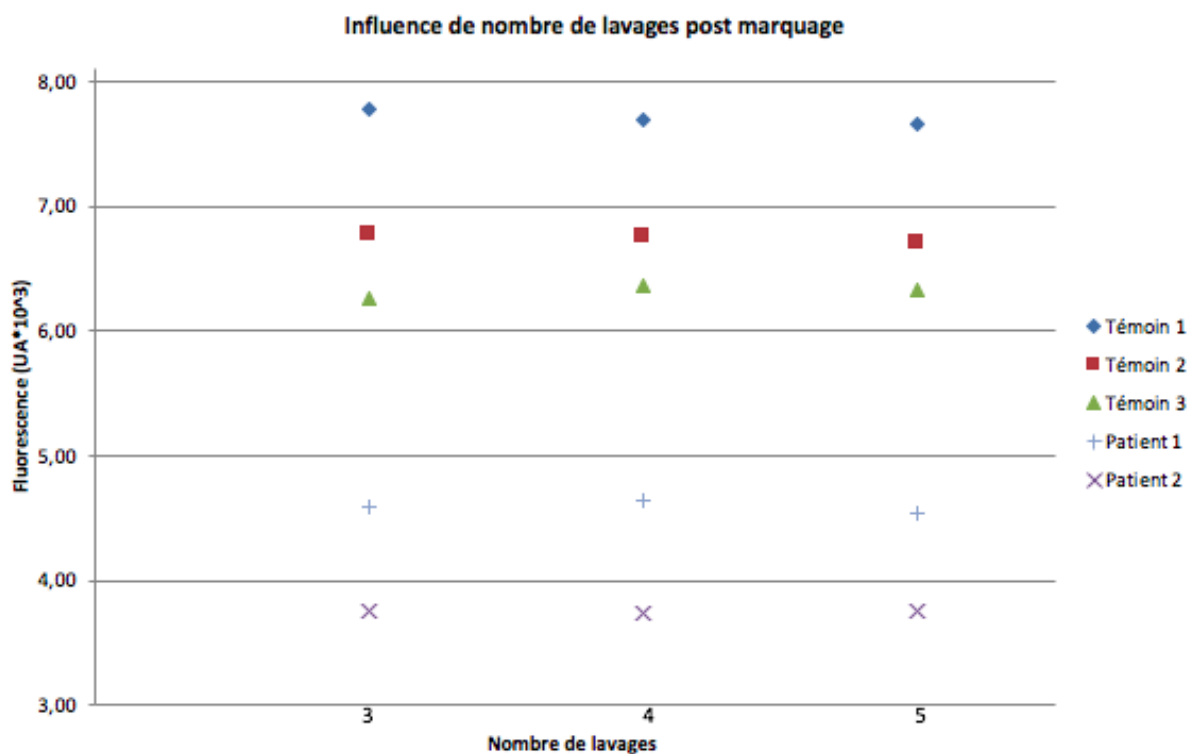


Figure 21 - Exemple de résultats représentant la fluorescence en fonction du nombre de lavages pour 3 témoins et 2 patients atteints de sphérocytose héréditaire

En conclusion, la baisse du nombre de lavages pré et post-marquage ainsi que le nombre de tubes à réaliser par patient et par témoin a permis un gain de temps de 30 minutes environ. Soit par patient 2 heures de technique au lieu de 2h30.

PARTIE 4 : EVALUATION DU DIAGNOSTIC DE SPHEROCYTOSE HEREDITAIRE PAR PINK TEST

Le pink test est utilisé pour le diagnostic étiologique de la sphérocytose héréditaire en complément des autres arguments cliniques et biologiques (sphérocytes au frottis sanguin, test de fragilité osmotique positif).

Pour réaliser cette étude, nous nous sommes appuyés sur le mode opératoire décrit anciennement par Vettore et al (70).

A la différence des autres techniques d'étude de la résistance osmotique, le pink test détermine l'hémolyse d'une faible quantité de sang contenue dans une solution de glycérol tamponnée à pH = 6,66 par du Bis-Tris et de l'HCl. Le Bis-Tris présente l'avantage d'avoir un pK proche du pH optimal de la réaction de lyse et d'avoir un pouvoir tampon plus important. Le pH de la solution d'osmolarité est donc stable (70).

1. Matériels et méthodes

1.1. Préanalytique

Le pré-analytique de cette technique consiste en un prélèvement d'un seul tube de sang total EDTA de 5 mL car la quantité nécessaire au test est très faible : 10 à 30 µL. L'acheminement du tube doit être fait dans les 2 heures à température ambiante. La conservation du tube se fait à 4°C et il est recommandé de faire le test dans les 24 heures (71).

1.2. Analytique

Matériel :

- Spectrophotomètre Jouan VP1012
- Cuves à spectrophotomètre de 2 mL
- Centrifugeuse
- Tube à hémolyse de 5 mL
- Pipette automatique
- Osmomètre
- pH mètre

Réactifs :

- Solution d'osmolarité 290 +/- 5 mOsmol/L
 - A préparer à l'avance :
 - Bis – Tris : 7,3g
 - Azide de sodium : 0,0505g
 - Glycérol 98 % : 5,517g

- NaCl : 1,11g
- Eau distillé qsp 500 mL

Commencez par mettre le glycérol dans un bécher avec le Bis-Tris. Rajouter ensuite l'azide de sodium, le NaCl et l'eau distillée.

Ajuster le pH à 6,66 avec HCl à 1M. Laisser une nuit à + 4°C et le lendemain, ajuster l'osmolarité à 290 +/- 5 mOsmol/L.

- Solution de triton X-100 à 2 % (solution de lyse conservé à l'abri de la lumière)
 - A préparer extemporanément : 40 µL de triton X-100 dans 1,96 mL d'eau distillée et vortexer pour solubiliser le triton qui est un liquide visqueux.

Mode opératoire :

Réaliser le test en double à la fois pour le patient et pour le témoin (taux normal d'hémoglobine).

Si le taux d'hémoglobine du patient est :

- Supérieur à 10 g/dL : réaliser un essai de 20 µL de sang total
- Inférieur à 10 g/dL : réaliser deux essais avec 10 µL et 20 µL de sang total

Dans chacun des tubes, mettre 3 mL de solution d'osmolarité à 290 mOsmol/L et agiter doucement les tubes par retournement.

Laisser 30 minutes à température ambiante.

Centrifuger 7 minutes à 2000 tours par minute (770g).

Lire au spectrophotomètre à 540 nm la densité optique DO1 du surnageant (le blanc correspond à la solution d'osmolarité seule).

Le tableau 8 ci-dessous résume la technique :

Tableau 8 - Mode opératoire du pink test

	Blanc	Témoin 1 (hémoglobine > 10 g/dL)	Patient 1 (hémoglobine > 10 g/dL)	Patient 2 (hémoglobine < 10 g/dL)	Patient 2 (hémoglobine < 10 g/dL)
Solution d'osmolarité (mL)	3	3	3	3	3
Sang total (µL)	0	10	10	10	20

Ajouter ensuite 75 µL de triton X-100 à 2 % et agiter au vortex pour lyser totalement les globules rouges.

Attendre 5 minutes et lire au spectrophotomètre à 540 nm la densité optique DO2 du surnageant.

Le résultat est un pourcentage d'hémolyse qui se calcul de la façon suivante : si le taux d'hémoglobine du patient est :

- Supérieur à 10 g/dL : $(DO1/DO2)*100$
- Inférieur à 10 g/dL : $[(DO1(20 \mu L) - DO1 (10 \mu L)) / ((DO2 (20 \mu L) - DO2 (10 \mu L))] * 100$

1.3. Post analytique

Si la valeur du pourcentage d'hémolyse est inférieure à 20 % alors le patient est considéré négatif à la sphérocytose héréditaire.

Il a été rapporté des faux positifs (environ 40 % des femmes enceinte dans le 3^{ème} trimestre, AHAI, hémodialysés, insuffisance rénale chronique) et des faux négatifs (certains cas de sphérocytose après splénectomie, sphérocytose chez l'enfant de moins de 4 mois car l'hémoglobine fœtale confère une résistance osmotique plus grande).

2. Validation de méthode

L'étude s'est déroulée de février 2018 à octobre 2019. Il s'agit de réaliser l'EMA et le pink test chez tous les patients connus ou suspect de sphérocytose héréditaire afin d'évaluer la sensibilité et la spécificité de la combinaison de ces deux tests.

2.1. Répétabilité

La répétabilité exprime la fidélité de la méthode sous des conditions opératoires identiques et sur un court intervalle de temps. Le CV obtenue sera comparé au CV limite choisi au préalable. Soit ici un CV de 5 % choisi arbitrairement car il n'existe pas de référentiel officiel et que ce seuil est répandu en biologie médicale. Plus la valeur du coefficient de variation est faible, plus l'estimation est précise.

L'étude est réalisée sur des échantillons de sang total et compare les pourcentages d'hémolyses obtenues grâce au CV (tableau 9) sur des sujets sains de l'Établissement Français du Sang (EFS) et sur des sujets atteints de sphérocytose héréditaire.

Tableau 9 - Essai de répétabilité du pink test

Répétabilité (20 valeurs)	Sujet sain EFS hémoglobine = 13,5 g/dL	Moyenne (%)	4,96
		Ecart type	0,43
		CV (%)	0,09
	Sujet sans pathologie du GR hémoglobine = 9,6 g/dL	Moyenne (%)	1,07
		Ecart type	0,62
		CV (%)	0,58
	Sujet atteint de SH hémoglobine = 10,3 g/dL	Moyenne (%)	32,10
		Ecart type	1,38
		CV (%)	0,04
	Sujet atteint de SH hémoglobine = 8,9 g/dL	Moyenne (%)	84,05
		Ecart type	3,71
		CV (%)	0,04

Les CV obtenus varient entre 0,04 et 0,58 % ce qui est faible.

En conclusion, le CV obtenu est inférieur au CV retenu par le laboratoire pour chacune des répétabilités effectuées. Cette technique est donc répétable.

2.2. Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire est la reproductibilité intra-laboratoire. Il faut que les résultats obtenus à partir d'un même échantillon, restent semblables lorsque l'analyse est réalisée à différents jours d'intervalle. Le CV du pourcentage d'hémolyse obtenue sera comparé au CV limite choisi au préalable. Soit ici un CV de 5 % choisi arbitrairement car il n'existe pas de référentiel officiel et que ce seuil est répandu en biologie médicale. Les essais sont réalisés sur 5 jours consécutifs.

Tableau 10 - Essai de reproductibilité du pink test

Reproductibilité (5 valeurs)	Sujet sain EFS hémoglobine = 13,1 g/dL	Moyenne (%)	4,57
		Ecart type	0,89
		CV (%)	0,20
	Sujet sain EFS hémoglobine = 15,8 g/dL	Moyenne (%)	2,50
		Ecart type	0,46
		CV (%)	0,18
	Sujet sain EFS hémoglobine = 15,6 g/dL	Moyenne (%)	4,65
		Ecart type	1,38
		CV (%)	0,30
	Sujet sans pathologie du GR hémoglobine = 7,8 g/dL	Moyenne (%)	14,36
		Ecart type	0,46
		CV (%)	3,24
	Sujet atteint de SH hémoglobine = 10,1 g/dL	Moyenne (%)	88,23
		Ecart type	2,58
		CV (%)	2,92
Sujet atteint de SH hémoglobine = 9,8 g/dL	Moyenne (%)	86,91	
	Ecart type	3,89	
	CV (%)	4,48	

Les CV obtenus varient entre 0,18 et 4,48 % ce qui est faible.

En conclusion, le CV obtenu est inférieur au CV retenu par le laboratoire pour chacune des reproductibilités effectuées. Cette technique est donc très reproductible mais uniquement sur 5 jours.

2.3. Évaluations des performances du test

Cette étude a fait l'objet d'une déclaration à la direction de la recherche clinique et de l'innovation au CHRU de Nancy (annexe 4). Elle a été effectuée dans un cadre réglementaire imposant un tableau anonyme associé à une table de correspondance.

La population étudiée contient :

- 29 patients sphérocytaires confirmés
- 4 patients avec suspicion de sphérocytose héréditaire mais le diagnostic final est non confirmé en raison de la crise du coronavirus
- 40 patients avec une pathologie des globules rouges (hors sphérocytose héréditaire)
- 64 patients avec une pathologie sans lien avec les globules rouges

Soit au total, 137 patients testés en pink test (dont 65 patients testés en EMA en parallèle).

La population étudiée a une moyenne d'âge de 20 ans avec un ratio homme/femme proche de 1 (70 femmes pour 67 hommes). Les moyennes et écarts types des paramètres de l'hémoграмme sont présentés dans les tableaux 11 et 12 :

Tableau 11 - Moyennes et écarts types des paramètres de l'hémoграмme de la population totale étudiée

Paramètres	Globules rouges (T/L)	Hb (g/dL)	Hte (%)	VGM (fL)	CCMH (g/dL)	TCMH (pg)
Moyennes	3,9	11,1	33,3	85,3	32,9	28,5
Écarts types	1,0	3,0	8,0	13,4	3,2	5,2

Tableau 12 - Moyennes et écarts types des paramètres de l'hémoграмme chez les patients confirmés sphérocytose héréditaire

Paramètres	Globules rouges (T/L)	Hb (g/dL)	Hte (%)	VGM (fL)	CCMH (g/dL)	TCMH (pg)
Moyennes	4,1	11,7	33,2	83,8	35,0	29,3
Écarts types	0,7	2,4	5,8	8,5	1,9	3,1

2.3.1. Caractéristiques du test et courbe ROC

La sensibilité d'un test est la probabilité que le test soit positif si la personne est atteinte de la maladie. Plus un test est sensible moins il comporte de faux négatifs (tests négatifs chez des personnes atteintes de la maladie) et mieux il permet, s'il est négatif, d'exclure la maladie.

La spécificité d'un test est la probabilité que le test soit négatif si la personne testée est indemne de la maladie. Plus un test est spécifique, moins il occasionne de faux positifs (tests positifs chez des personnes indemnes de la maladie) et mieux il permet, s'il est positif, d'affirmer la maladie.

La valeur prédictive positive (VPP) d'un test est la probabilité que la personne soit réellement malade si son test est positif.

La valeur prédictive négative (VPN) d'un test est la probabilité que la personne n'ait pas la maladie si son test est négatif.

Les tableaux 13 et 14 suivants présentent les résultats des tests diagnostiques :

Tableau 13 - Évaluation du pink test

		SH		Total
		+	-	
PINK TEST	+	28	10	38
	-	2	97	99
	Total	30	107	137

En comparaison avec l'EMA :

Tableau 14 - Évaluation du test EMA

		SH		Total
		+	-	
EMA	+	29	0	29
	-	1	35	36
	Total	30	35	65

Le tableau 15 suivant récapitule les performances diagnostiques des 2 tests :

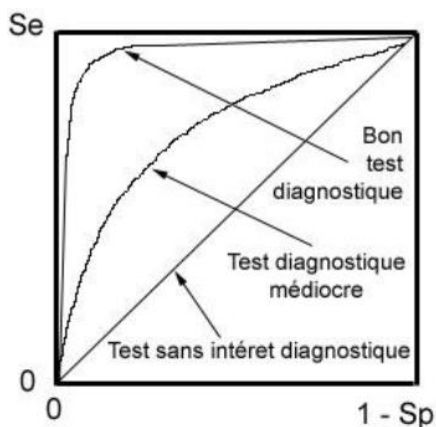
Tableau 15 - Performances diagnostiques du pink test et de l'EMA

	Pink test (n=137)	EMA (n=65)
Sensibilité (%)	93,3	96,7
Spécificité (%)	90,7	100,0
VPP (%)	73,7	100,0
VPN (%)	98,0	100,0

Les performances diagnostiques des tests sont évaluées à l'aide de leur sensibilité, spécificité et valeurs prédictives positives et négative.

Dans la littérature, la sensibilité du pink test est de 91 % et la spécificité est de 79 %. L'EMA a une sensibilité de 93 % et une spécificité de 98 % (61) (70).

La courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) correspond à la représentation de la sensibilité (fraction de vrais positifs) en fonction de 1-spécificité (fraction de faux positifs), pour toutes les valeurs seuils du test. Cet outil permet d'analyser la sensibilité et spécificité d'un test. Pour avoir un index simple et quantitatif de la discrimination du test, on calcule l'aire sous la courbe (AUC) : un test parfait aura une AUC égale à 1 (la courbe longeant l'angle gauche de la représentation) ; un test sans valeur discriminante, aura une valeur d'AUC égale à 0,5. Cependant, la courbe ROC doit être analysée avec précaution : il faut toujours se référer au but visé par la réalisation du test (test de dépistage, test de confirmation) et à la population choisie pour le test (72).



(Se : sensibilité ; Sp : spécificité)

Figure 22 - Différents aspects de courbes ROC et potentiel diagnostique d'un test (72)

Nous avons établi une courbe ROC pour le pink test dans la figure suivante à l'aide du logiciel Graphpad Prism ® avec $p < 0,0001$.

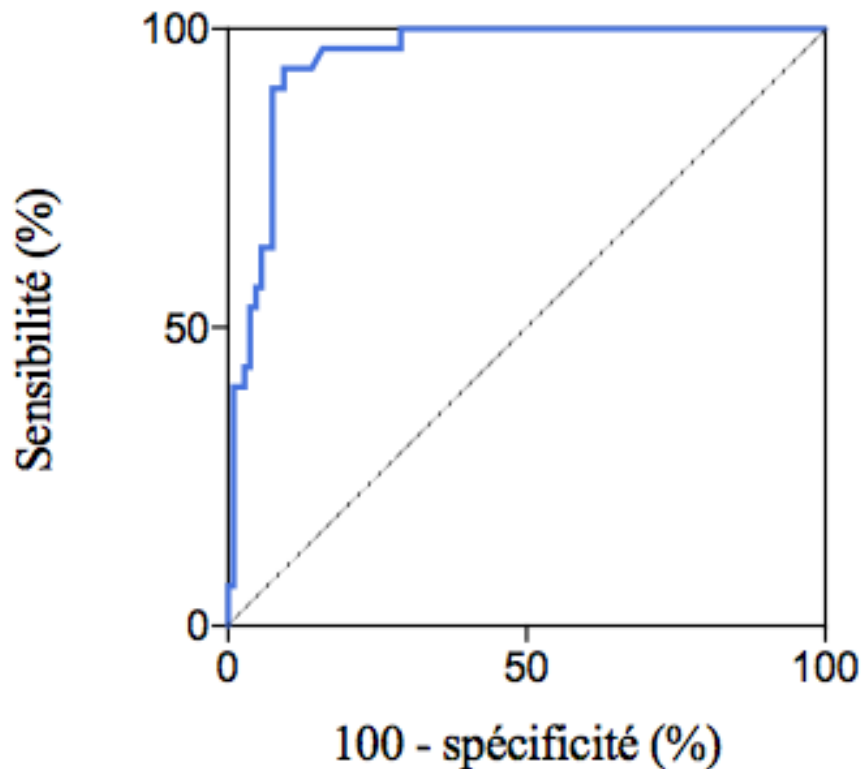


Figure 23 - Courbe ROC du pink test

L'AUC est égale à 0,95. Elle est significativement différente de 0,5 ($p < 0,0001$). La valeur seuil optimale correspond au point le plus proche de l'idéal (1;1) ou au point le plus loin de la diagonale. Elle est de 20,4 % pour une sensibilité de 93,3 % et une spécificité de 90,7 %. Notre étude retrouve le seuil de 20 % indiqué dans la littérature (70).

2.3.2. Analyse du coût

Concernant le coût réactif, l'EMA coûte environ 3 € par patient et le pink test 0,23 € par patient. De plus, l'EMA nécessite environ 2 heures de temps technicien contre 1 heure pour le pink test.

La cotation de ces analyses tient compte du B qui est égale à 0,27 €. Le pink test fait partie des actes de mesure de la résistance globulaire osmotique dans la nomenclature des actes de biologie médicale et coûte 8,1 € (B30, acte III2).

L'EMA est précisé dans la liste complémentaire des actes de biologie médicale et coûte 10,8 € (acte E149).

L'ektacytométrie est aussi dans la liste complémentaire et coûte 81,0 € (acte E012).

3. Discussion

Le diagnostic de sphérocytose héréditaire et sa différenciation des autres causes d'hémolyse sont importants pour la prise en charge du patient. En effet, il s'agit de l'anémie hémolytique héréditaire régénérative la plus fréquente dans la population européenne. De plus, la clinique est non spécifique.

Au CHRU de Nancy, le diagnostic de sphérocytose héréditaire repose sur l'hémogramme, l'examen du frottis sanguin et le test EMA mais nécessite parfois une recherche par ektacytométrie pour confirmation diagnostique.

Néanmoins, l'ektacytométrie nécessite une analyse externalisée avec un délai de résultat d'une dizaine de jours ce qui retarde le diagnostic et nécessite un nouveau prélèvement avec des conditions pré-analytiques strictes (envoi à 4°C dans les 24h).

De plus, les recommandations proposent d'effectuer au moins deux tests différents, de préférence le test EMA et un test de fragilité osmotique comme le pink test (61).

Dans une démarche globale d'amélioration de la stratégie diagnostique au laboratoire, nous nous sommes tout d'abord proposés d'améliorer le protocole de l'EMA qui est long et fastidieux. Cela a permis de diminuer le temps technique de trente minutes ce qui est non négligeable. En effet, les résultats de l'EMA sont parfois retardés en raison de la contrainte logistique pour la disponibilité du cytomètre et la technique reste tout de même chronophage (2 heures). De plus, l'EMA rend parfois un résultat dit en zone grise ne permettant pas de conclure ce qui contraint à envoyer un bilan complémentaire pour réaliser l'ektacytométrie. Néanmoins, l'EMA offre d'excellentes performances diagnostiques avec une sensibilité de 96,7 % et une spécificité de 100 %. Les VPP et VPN sont de 100 % dans notre cohorte. Les sensibilités, spécificités, VPP et VPN obtenues sont plus élevées que celles retrouvées dans la littérature (61). En effet, nous avons peu de nouveau-nés et d'enfants et peu de patients avec un résultat en zone grise dans notre cohorte.

Ensuite, nous avons testé le pink test pour évaluer sa place dans la stratégie diagnostique de la sphérocytose héréditaire au laboratoire. Pour commencer, cette technique est particulièrement adaptée aux nouveau-nés et aux enfants en raison de la faible quantité de sang nécessaire. Il est peu cher et rapide (1 heure). De plus, la courbe ROC indique qu'il s'agit d'un bon test de dépistage au seuil de 20 % comme retrouvé dans la littérature (70). Sa sensibilité de 93,3 % et sa VPN de 98 % lui permettent d'être le test de première intention à utiliser en cas de suspicion de sphérocytose héréditaire. La sensibilité et la spécificité sont plus élevées que celles rapportées dans la littérature. Cependant, il faut rester prudent car notre cohorte est de seulement 29 patients confirmés atteints de sphérocytose héréditaire.

Au vu de ces résultats, une nouvelle stratégie diagnostique pourrait être élaborée en combinant ces 2 tests. Le pink test est proposé en première intention comme diagnostic d'exclusion de la sphérocytose héréditaire.

Si le résultat est inférieur à 20 %, le diagnostic de sphérocytose héréditaire est très peu probable. Il faudra le confronter à l'hémogramme et au frottis sanguin.

Si le résultat est supérieur ou égal à 20 %, la sphérocytose est probable et se doit d'être confirmée par l'EMA en deuxième intention (test de confirmation) :

- Si l'EMA rend un résultat supérieur à 20 %, alors la sphérocytose héréditaire est confirmée.
- Si l'EMA rend un résultat dit en zone grise, alors la sphérocytose héréditaire est confirmée également. En effet, l'étude de Bianchi *et al.* (61) renforce le fait que même avec un résultat d'EMA en zone grise (16 à 20 %), on peut considérer le diagnostic de sphérocytose comme confirmé avec un résultat de pink test positif car ils utilisent un seuil de positivité d'EMA à 11 % soit bien plus bas que le nôtre.

S'il s'agit d'un nouveau-né (< 4 mois), il faudra réaliser d'emblée l'EMA car le pink test peut rendre des résultats faussement négatifs car l'hémoglobine fœtale possède une résistance osmotique plus grande aux hématies. Les recommandations proposent de faire un test de fragilité osmotique en plus de l'EMA mais avec cette caractéristique de l'hémoglobine fœtale chez les nouveau-nés, tous les tests de fragilités peuvent être touchés.

Si le résultat est inférieur à 16 %, une recherche par ektacytométrie sera réalisée pour conclure.

Ainsi, l'algorithme suivant peut être mis en place :

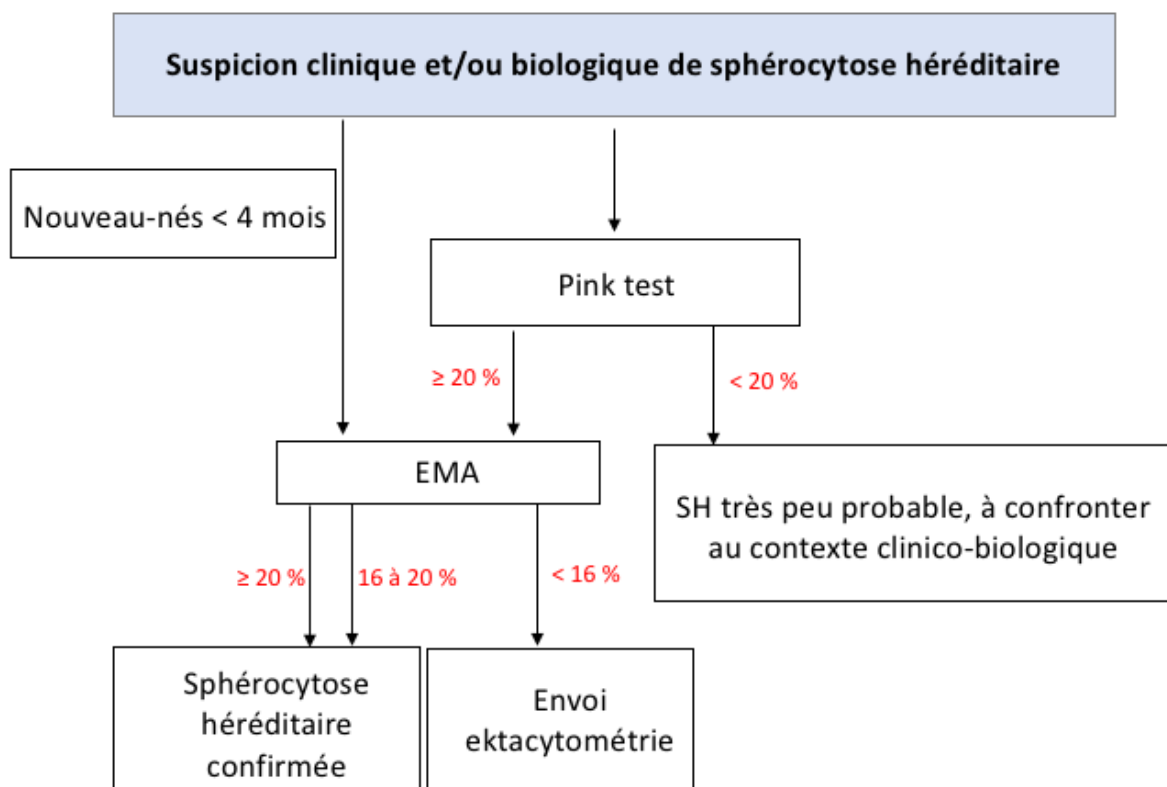


Figure 24 - Arbre décisionnel pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire au CHRU de Nancy

Cette stratégie est en accord avec les recommandations pour le diagnostic et la prise en charge de la sphérocytose héréditaire.

L'intérêt de combiner les 2 tests est de remédier aux interférences que peut subir le pink test. En effet, des faux positifs (environ 40 % des femmes enceintes dans le 3^{ème} trimestre, AHAI, hémodialysés, insuffisants rénaux chroniques) et des faux négatifs (certains cas de sphérocytose après splénectomie, sphérocytoses chez l'enfant de moins de 4 mois) ont parfois été rapportés. Le test EMA n'est pas influencé par ces conditions, d'où l'intérêt possible de la combinaison de ces deux tests.

CONCLUSION GENERALE

En conclusion, ce travail montre que le pink test peut être un outil efficace pour le dépistage de la sphérocytose héréditaire en combinaison avec l'EMA. Il est, en effet, plus rapide, moins coûteux et ne nécessite pas de mobiliser un automate de cytométrie en flux. Ce test n'exclut évidemment pas la lecture attentive du frottis et l'interprétation de l'hémogramme. Sa mise en place nous permettrait également de suivre les recommandations. Il apparaît donc comme une technique de choix en première intention et évite de passer par des examens plus chronophages dans une majorité des cas.

Les résultats de l'étude nous ont permis d'obtenir un arbre décisionnel pour la stratégie diagnostique. Cet algorithme est à tester en prospectif en étoffant notre population et le nombre de nouveau-nés (peu présents dans notre cohorte) au vu des possibles faux négatifs que le pink test peut engendrer chez les nouveau-nés principalement.

BIBLIOGRAPHIE

1. Packman C. The spherocytic Haemolytic Anaemias. *Br J Haematol.* 2001;112(4):888-99.
2. Morton N, Mackinney A, Kosower N, Schilling R, Gray M. Genetics of Spherocytosis. *Am J Hum Genet.* 1962;14(2):170-84.
3. Eber S, Pekrun A, Neufeldt A, Schröter W. Prevalence of increased osmotic fragility of erythrocytes in German blood donors: Screening using a modified glycerol lysis test. *Ann Hematol.* 1992;64(2):88-92.
4. Zandecki M. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [En ligne]. Disponible sur : <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/90-spherocytose-hereditaire>. (Page consultée le 15/12/2019).
5. Bader-Meunier B, Cynober T, Tchernia G. Maladies de la membrane du globule rouge. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie.* 2001;4(3):217-22.
6. Singer S, Nicolson G. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 1972;175(4023):720-31.
7. Delaunay J, Garçon L. Anémies hémolytiques d'origine membranaire. *EMC - Hématologie.* 2009;4(3):1-9.
8. Delaunay J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Rev.* 2007;21(1):1-20.
9. Contreras F-X, Sánchez-Magraner L, Alonso A, Goñi F. Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes. *FEBS Lett.* 2010;584(9):1779-86.
10. Mohandas N, An X. New insights into function of red cell membrane proteins and their interaction with spectrin-based membrane skeleton. *Transfus Clin Biol J Soc Francaise Transfus Sang.* 2006;13(1-2):29-30.
11. Boivin P. Maladies congénitales du squelette de la membrane érythrocytaire. *médecine/sciences.* 1985;1(3):134.
12. Bichis M, Huber A. Les maladies héréditaires de la membrane érythrocytaire: du tableau clinique aux mécanismes génétiques et moléculaires sous-jacents. *Mal Héréditaires Membr Érythrocytaire* 2000;58(3):277-89.
13. Nunomura W, Takakuwa Y. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca²⁺ and calmodulin. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2006;11:1522-39.

14. Rybicki A, Heath R, Wolf J, Lubin B, Schwartz R. Deficiency of protein 4.2 in erythrocytes from a patient with a Coombs negative hemolytic anemia. Evidence for a role of protein 4.2 in stabilizing ankyrin on the membrane. *J Clin Invest*. 1988;81(3):893-901.
15. Hassoun H, Palek J. Hereditary spherocytosis: a review of the clinical and molecular aspects of the disease. *Blood Rev*. 1996;10(3):129-47.
16. Boivin P. Interactions moléculaires des protéines de la membrane et déformabilité érythrocytaire. *Acta médica portuguesa*. 1983;4(1): 13-36.
17. Korones D, Pearson H. Normal erythrocyte osmotic fragility in hereditary spherocytosis. *J Pediatr*. 1989;114(2):264-6.
18. Stenson P, Mort M, Ball E, Shaw K, Phillips A, Cooper D. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet*. 2014;133(1):1-9.
19. Iolascon A, Giudice E, Perrotta S, Alloisio N, Morle L, Delaunay J. Hereditary spherocytosis: from clinical to molecular defects. *Haematologica*. 1998;83(3):240-57.
20. Bolton-Maggs P, Stevens R, Dodd N, Lamont G, Tittensor P, King M-J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. *Br J Haematol*. 2004;126(4):455-74.
21. An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol*. 2008;141(3):367-75.
22. King M-J, Garçon L, Hoyer JD, Iolascon A, Picard V, Stewart G, et al. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(3):304-25.
23. Perrotta S, Gallagher P, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet Lond Engl*. 2008;372(9647):1411-26.
24. Jarolim P, Rubin H, Brabec V, Palek J. Comparison of the ankyrin (AC)n microsatellites in genomic DNA and mRNA reveals absence of one ankyrin mRNA allele in 20 % of patients with hereditary spherocytosis. *Blood*. 1995;85(11):3278-82.
25. Hassoun H, Vassiliadis J, Murray J, Njolstad P, Rogus J, Ballas S, et al. Characterization of the underlying molecular defect in hereditary spherocytosis associated with spectrin deficiency. *Blood*. 1997;90:398-406.
26. Lombardi C, Francese M, Nobili B, Conte ML, Amendola G, et al. Frequent de novo monoallelic expression of β -spectrin gene (SPTB) in children with hereditary spherocytosis and isolated spectrin deficiency. *Br J Haematol*. 1998;101(2):251-4.

27. Alloisio N, Texier P, Vallier A, Ribeiro M, Morlé L, Bozon M, et al. Modulation of clinical expression and band 3 deficiency in hereditary spherocytosis. *Blood*. 1997;90(1):414-20.
28. Alloisio N, Maillet P, Carré G, Texier P, Vallier A, Baklouti F, et al. Hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. Association with a nonsense mutation of the band 3 gene (allele Lyon), and aggravation by a low-expression allele occurring in trans (allele Genas). *Blood*. 1996;88(3):1062-9.
29. Perrotta S, Borriello A, Scaloni A, De Franceschi L, Brunati A, Turrini F, et al. The N-terminal 11 amino acids of human erythrocyte band 3 are critical for aldolase binding and protein phosphorylation: implications for band 3 function. *Blood*. 2005;106(13):4359-66.
30. Ribeiro M, Alloisio N, Almeida H, Gomes C, Texier P, Lemos C, et al. Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with the total absence of band 3. *Blood*. 2000;96(4):1602-4.
31. Gallagher P, Forget B. Hematologically important mutations: band 3 and protein 4.2 variants in hereditary spherocytosis. *Blood Cells Mol Dis*. 1997;23(3):417-21.
32. Wandersee N, Birkenmeier C, Gifford E, Mohandas N, Barker J. Murine recessive hereditary spherocytosis, sph/sph, is caused by a mutation in the erythroid alpha-spectrin gene. *Hematol J Off J Eur Haematol Assoc*. 2000;1(4):235-42.
33. Cynober T, Miélot F, Schischmanoff P, Delaunay J, Tchernia G. La sphérocytose héréditaire. *Rev Fr Lab*. 2000;2000(324):45-9.
34. Van de Wyngaert Z, Guitton C, Garçon L. Hereditary Spherocytosis: Indication of splenectomy and its long-term complications. *Hématologie*. 2018;24(2):126-33.
35. Rocha S, Rebelo I, Costa E, Catarino C, Belo L, Castro E, et al. Protein deficiency balance as a predictor of clinical outcome in hereditary spherocytosis. *Eur J Haematol*. 2005;74(5):374-80.
36. Iolascon A, Andolfo I, Barcellini W, Corcione F, Garçon L, Franceschi L, et al. Recommendations for splenectomy in hereditary hemolytic anemias. *Haematologica* [En ligne]. Disponible sur : <http://www.haematologica.org/content/early/2017/05/19/haematol.2016.16116626> mai 2017 (Page consultée le 26 février 2020)
37. Wyngaert Z, Guitton C, Garçon L. Place de la splénectomie dans le traitement de la sphérocytose héréditaire et complications au long cours. *Hématologie*. 2018;24(2):126-33.
38. Pincez T, Guitton C, Gauthier F, de Lambert G, Picard V, Fénéant-Thibault M, et al. Long-term follow-up of subtotal splenectomy for hereditary spherocytosis: a single-center study. *Blood*. 2016;127(12):1616-8.

39. Davies J, Lewis M, Wimperis J, Rafi I, Ladhani S, Bolton-Maggs P, et al. Review of guidelines for the prevention and treatment of infection in patients with an absent or dysfunctional spleen: prepared on behalf of the British Committee for Standards in Haematology by a working party of the Haemato-Oncology task force. *Br J Haematol*. 2011;155(3):308-17.
40. Guitton C, Garçon L, Cynober T, Gauthier F, Tchernia G, Delaunay J, et al. Sphérocytose héréditaire : recommandations pour le diagnostic et la prise en charge chez l'enfant. *Arch Pédiatrie*. 2008;15(9):1464-73.
41. Tchernia G, Delhommeau F, Perrotta S, Cynober T, Nobili B, Rohrlich P, et al. Recombinant erythropoietin therapy as an alternative to blood transfusions in infants with hereditary spherocytosis. *Hematol J Off J Eur Haematol Assoc EHA*. 2000;1:146-52.
42. Tamary H, Aviner S, Freud E, Miskin H, Krasnov T, Schwarz M, Yaniv I. High incidence of early cholelithiasis detected by ultrasonography in children and young adults with hereditary spherocytosis. 2003;25(12):952-4.
43. Croom R, McMillan C, Orringer E, Sheldon G. Hereditary spherocytosis. Recent experience and current concepts of pathophysiology. *Ann Surg*. 1986;203(1):34-9.
44. Rutkow I. Twenty years of splenectomy for hereditary spherocytosis. *Arch Surg Chic Ill 1960*. 1981;116(3):306-8.
45. Granel B, Serratrice J, Rey J, David M, Pache X, Bernit E, et al. Érythroblastopénie aiguë transitoire intrafamiliale et sphérocytose héréditaire : responsabilité du parvovirus B19. 2001;22(7):664-7.
46. Delaunay J, Tchernia G. Hereditary stomatocytosis revisited : from stomatin to *Caenorhabditis elegans*. *Hématologie*. 1998;3(6):501-8.
47. Garçon LO. Dysérythrocytoses congénitales. *Hozirons hématol*. 2014;4(1):1-4.
48. Clark M, Mohandas N, Shohet S. Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. *Blood*. 1983;61(5):899-910.
49. Cynober T, Mohandas N, Tchernia G. Red cell abnormalities in hereditary spherocytosis: Relevance to diagnosis and understanding of the variable expression of clinical severity. *J Lab Clin Med*. 1996;128(3):259-69.
50. Parpart A, Lorenz P, Parpart E, Gregg J, Chase A. The osmotic resistance (fragility) of human red cells 1. *J Clin Invest*. 1947;26(4):636-40.
51. Eber SW, Armbrust R, Schröter W. Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: Relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility, and autohemolysis. *J Pediatr*. 1990;117(3):409-16.

52. Iglauer A, Reinhardt D, Schröter W, Pekrun A. Cryohemolysis test as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. *Ann Hematol.* 1999;78(12):555-7.
53. Streichman S, Gescheidt Y. Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: Correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. *Am J Hematol.* 1998;58(3):206-12.
54. Romero R, Poo J, Robles J, Uriostegui A, Vargas F, Majluf-Cruz A. Usefulness of cryohemolysis test in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Arch Med Res.* 1997;28(2):247-51.
55. Bucx M, Breed W, Hoffmann J. Comparison of acidified glycerol lysis test, Pink test and osmotic fragility test in hereditary spherocytosis: effect of incubation. *Eur J Haematol.* 1988;40(3):227-31.
56. Cobb C, Beth A. Identification of the eosinyl-5-maleimide reaction site on the human erythrocyte anion-exchange protein: overlap with the reaction sites of other chemical probes. *Biochemistry.* 1990;29(36):8283-90.
57. Pan R, Cherry R. Evidence That Eosin-5-maleimide Binds Close to the Anion Transport Site of Human Erythrocyte Band 3: A Fluorescence Quenching Study. *Biochemistry.* 1995;34(14):4880-8.
58. King M-J, Smythe J, Mushens R. Eosin-5-maleimide binding to band 3 and Rh-related proteins forms the basis of a screening test for hereditary spherocytosis. *Br J Haematol.* 2004;124(1):106-13.
59. Do-Rouviere J-A. Diagnostic de la spherocytose hereditaire par cytométrie en flux. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Lorraine, 2008, 125p.
60. Ciepiela O. Old and new insights into the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Ann Transl Med* 2018;6(17):339.
61. Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, Marcello A, Porretti L, Cortelezzi A, et al. Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics. *Haematologica.* 2012;97(4):516-23.
62. More T, Dalal B, Devendra R, Warang P, Shankarkumar A, Kedar P. Applications of imaging flow cytometry in the diagnostic assessment of red cell membrane disorders. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020;98(3):238-49.
63. Debaugnies F, Cotton F, Boutique C, Gulbis B. Erythrocyte membrane protein analysis by sodium dodecyl sulphate-capillary gel electrophoresis in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(3):485-92.

64. King M-J, Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int J Lab Hematol.* 2013;35(3):237-43.
65. Shibuya A, Kawashima H, Tanaka M. Analysis of erythrocyte membrane proteins in patients with hereditary spherocytosis and other types of haemolytic anaemia. *Hematol Amst Neth.* 2018;23(9):669-75.
66. Bolton-Maggs P, Langer J, Iolascon A, Tittensor P, King M-J. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis-2011 update. *Br J Haematol.* 2012;156(1):37-49.
67. Park S. Chan Screening For Hereditary Spherocytosis: EMA Binding Test and Flow Cytometric Osmotic Fragility Test Are Recommended, But Cryohemolysis Test Is Not Recommended *Blood* 2013, 122(21):3425.
68. Bianchi P, Fermo E, Zanella A. Reply to “Testing for hereditary spherocytosis: a French experience”. *Haematologica.* 2012;97(12):48-52.
69. Ciepiela O, Adamowicz-Salach A, Bystrzycka V, Lukasik J, Kotula I. Mean corpuscular volume of control red blood cells determines the interpretation of eosin-5'-maleimide (EMA) test result in infants aged less than 6 months. *Ann Hematol.* 2015;94(8):1277-83.
70. Vettore L, Zanella A, Molaro L, De Matteis C, Pavesi M, Mariani M. A New Test for the Laboratory Diagnosis of Spherocytosis. *Acta Haematol.* 1984;72(4):258-63.
71. Dumézy F, Roumier C. Test à l'EMA ou Test à l'éosine 5'maléimide. [En ligne]. Disponible sur : http://biologiepathologie.chru-lille.fr/Flash_infos/Test_EMA.pdf (Page consultée le 23 mars 2020).
72. Perneger T, Perrier A. Analyse d'un test diagnostique : courbe ROC, ou « receiver operating characteristic ». *Rev Mal Respir.* 2004;21:398-401.

ANNEXES

Annexe 1 : Grade et qualité des recommandations du British Society of Haematology

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

Force des recommandations (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation)

Grade 1 : grade fort : des recommandations fortes sont émises lorsqu'il y a une forte confiance dans le fait que les bénéfices l'emportent sur les risques. Le grade 1 de recommandations peut être appliqué uniformément à la plupart des patients. Considérés comme « recommandés ».

Grade 2 : grade faible : quand l'ampleur des bénéfices est incertaine, une recommandation de grade faible est émise. Ce grade nécessite une application judicieuse à des patients au cas par cas. Considéré comme « suggérés ».

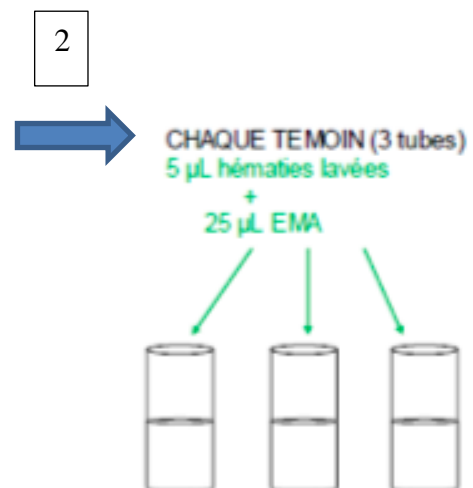
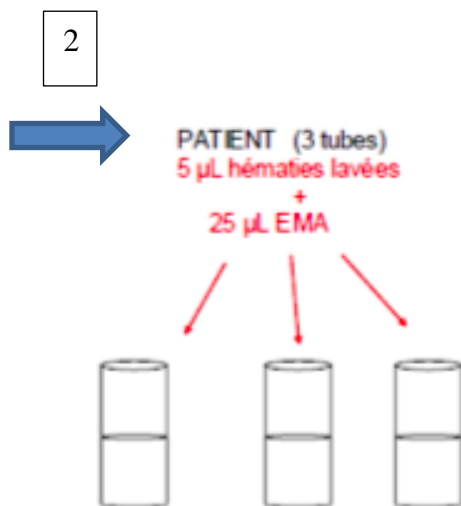
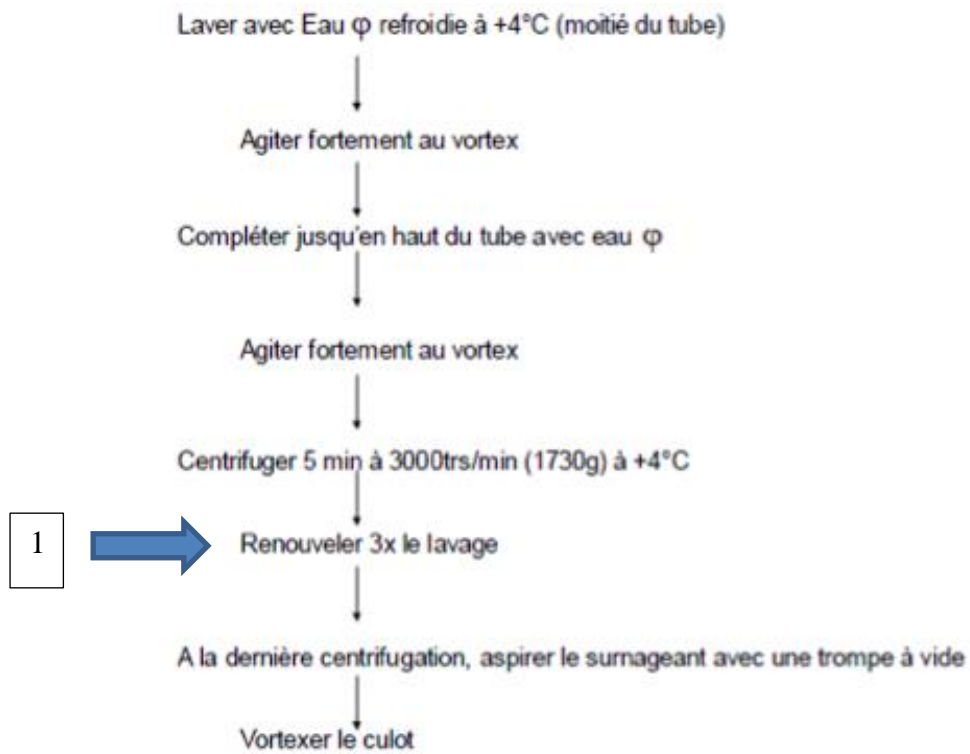
Qualité des données et définitions : (Quality of evidence and definitions)

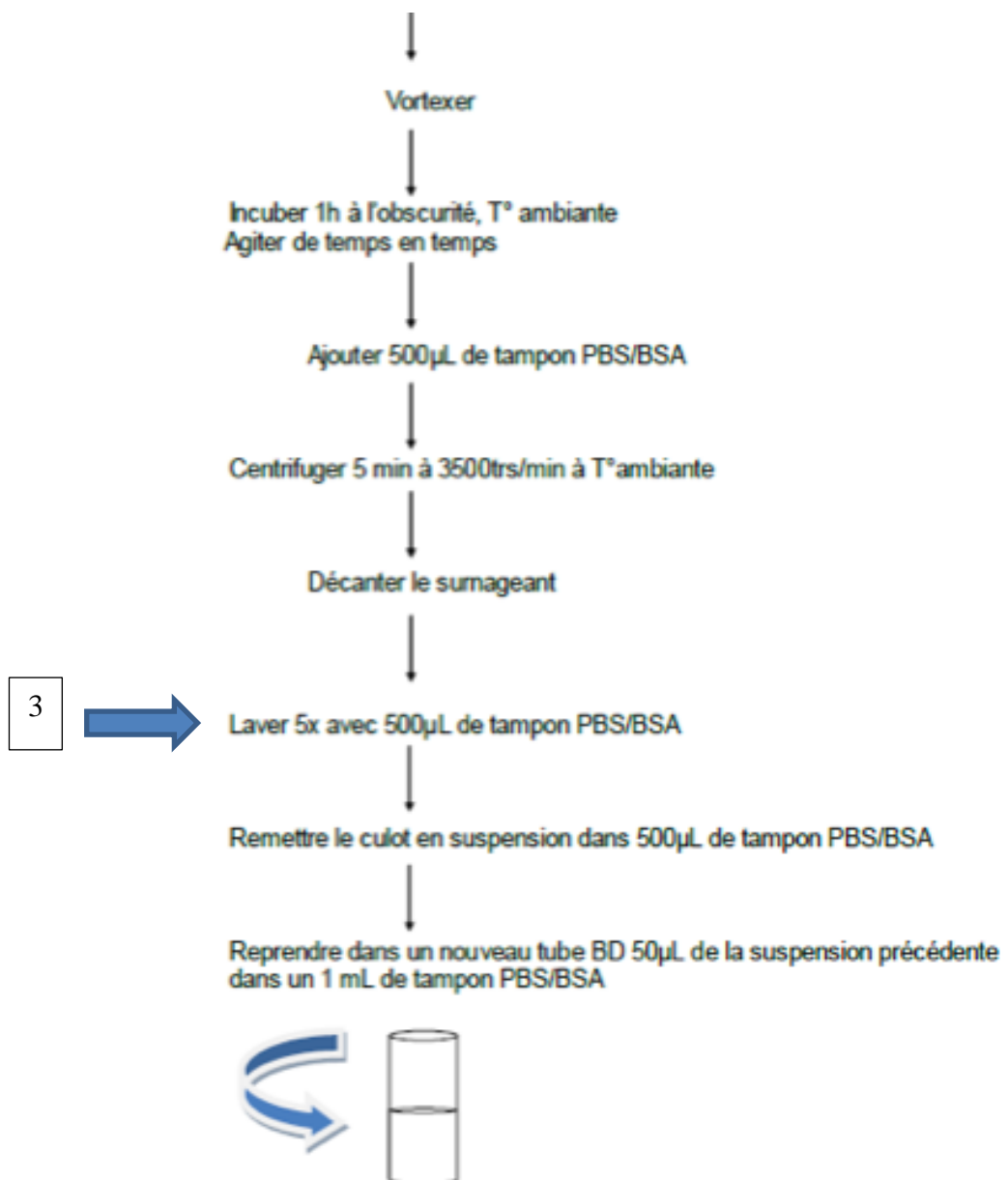
(A) Qualité élevée : des recherches supplémentaires ont peu de chance de modifier la confiance dans les bénéfices apportées par le traitement. Ce sont des données dérivées d'essais cliniques randomisés sans biais importants.

(B) Qualité modérée : des recherches supplémentaires pourraient modifier la confiance dans les bénéfices apportées par le traitement. Ce sont des données fournies par des essais cliniques randomisés avec des biais importants, des séries observationnelles ou par des séries des cas.

(C) Qualité faible : des recherches supplémentaires pourraient modifier la confiance dans les bénéfices apportées par le traitement de façon importante. Ce sont des données issues d'études observationnelles, de séries des cas ou juste d'opinions personnelles.

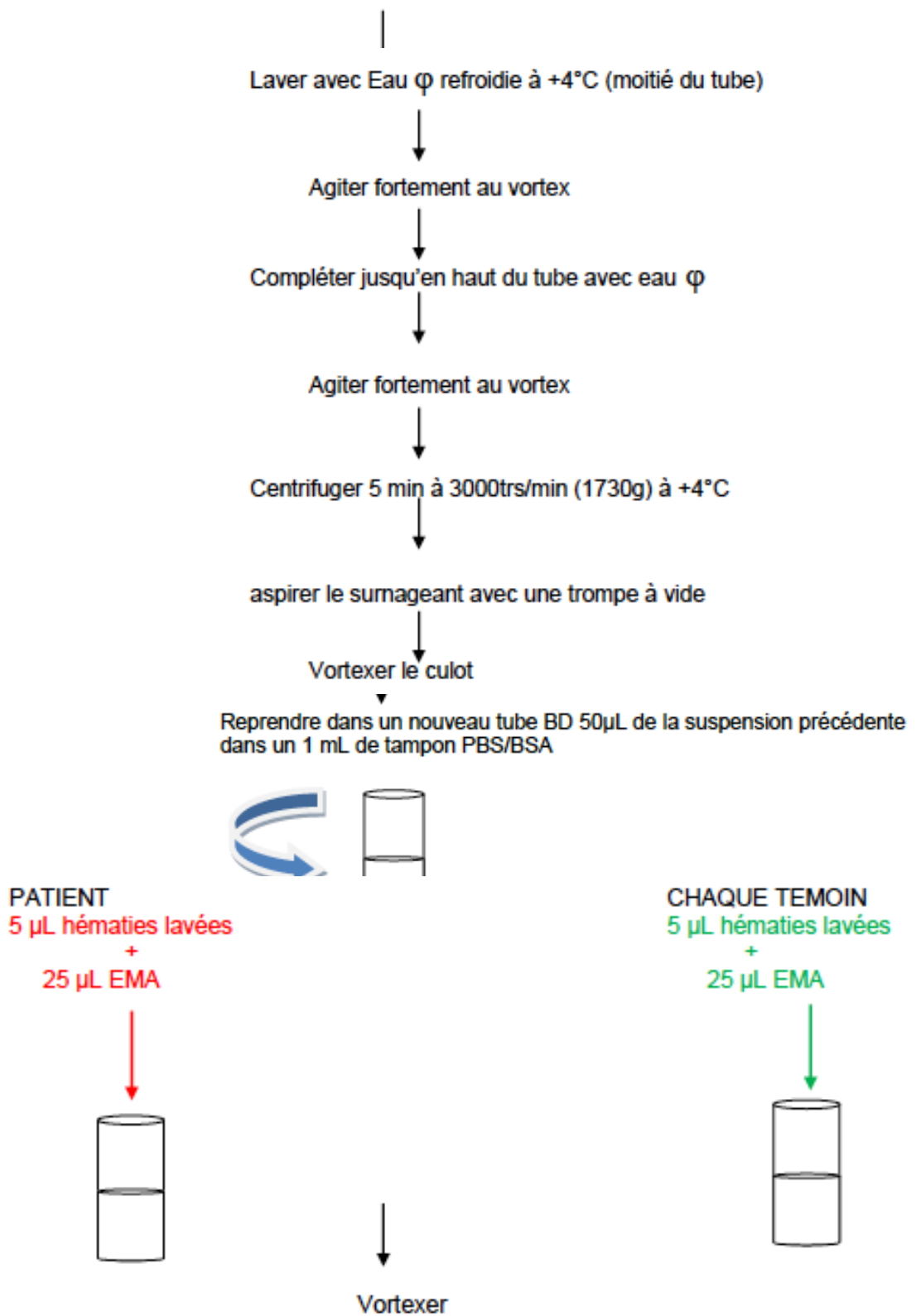
Annexe 2 : Protocole EMA du CHRU de Nancy avant amélioration





Lecture au cytomètre, acquisition 15000 événements sur GR, mode LOW
En cas de lecture différée, conservation des tubes à +4°C à l'obscurité

Annexe 3 : Protocole EMA du CHRU de Nancy après amélioration



Annexe 4 : Résumé du projet de recherche

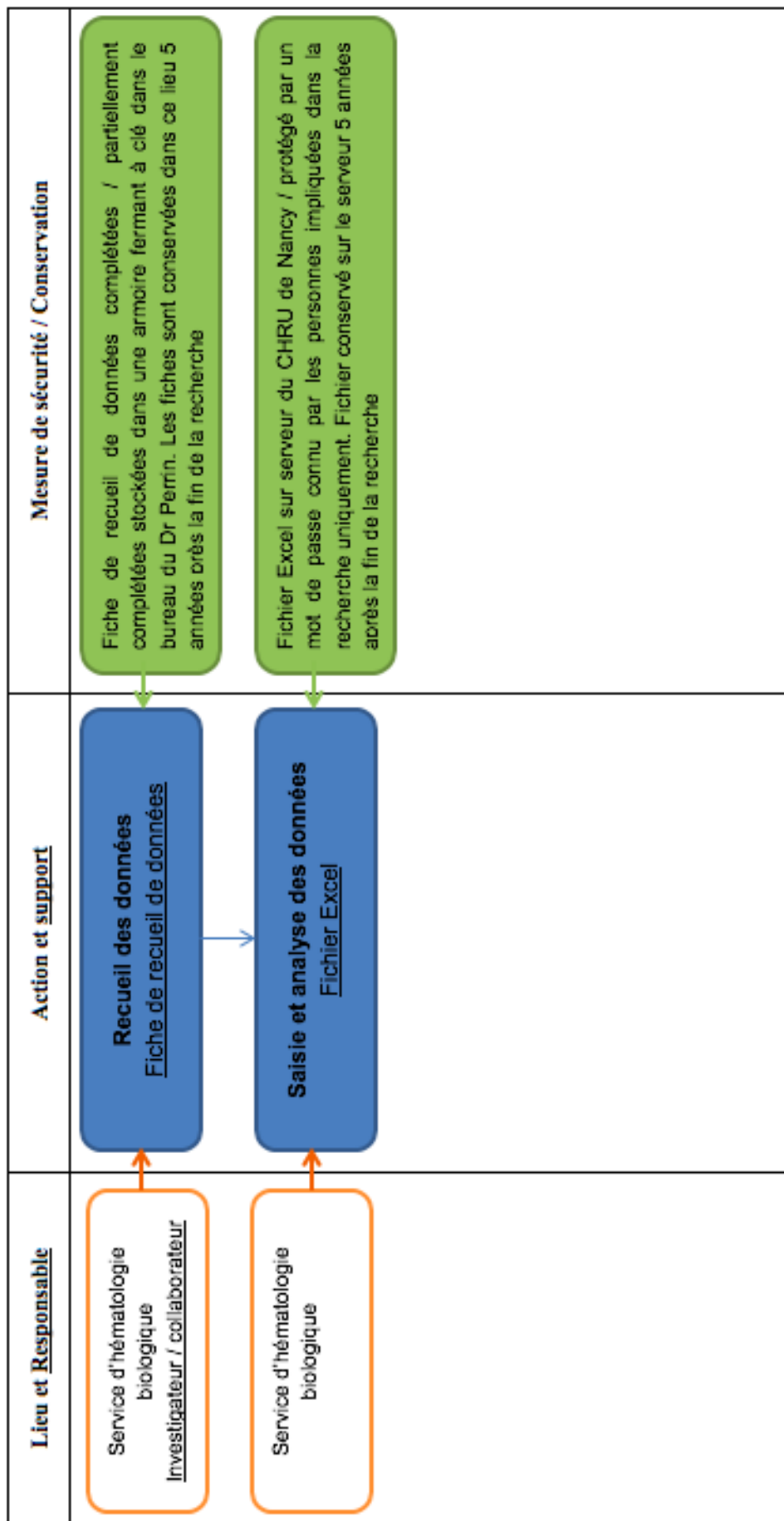
Titre	Optimisation du diagnostic de sphérocytose héréditaire (SH) au service d'hématologie biologique du CHRU de Nancy
Promoteur de la recherche	CHRU de Nancy
Personnes contact	<ul style="list-style-type: none">• Nom et mail du demandeur (étudiant si applicable) : HAJJAR Olivia, interne en biologie médicale hajjar123@hotmail.fr• Nom et coordonnées du responsable de l'étude Docteur PERRIN Julien, MCU-PH Service hématologie biologique julien.perrin@chru-nancy.fr• Nom et structure d'appartenance du Méthodologiste: /
Service(s) concerné(s) par la recherche	<ul style="list-style-type: none">• Service : Service hématologie biologique, Dr DEVIGNES
Version du résumé	Version 01 du 13/11/2018
Nombre de centres	<i>Etude monocentrique : CHRU Nancy</i>
Justification / contexte/ hypothèse	<p>La sphérocytose héréditaire (ou maladie de Minkowski Chauffard) est la plus fréquente des anémies hémolytiques corpusculaires par anomalie de la membrane érythrocytaire. Plusieurs tests existent pour permettre son diagnostic, mais les performances de ceux-ci ne sont pas équivalentes en termes de sensibilité/spécificité. Le CHRU, de par son statut de Centre de Compétences Syndromes Drépanocytaires Majeurs, Thalassémies et autres pathologies rares du Globule Rouge et de l'Érythroïèse, se doit de disposer d'une stratégie diagnostique de cette affection aussi performante que possible.</p> <p>Sur la base des travaux de Bianchi et al, une stratégie diagnostique reposant sur l'association du test EMA (réalisé actuellement au CHRU) avec un test de fragilité osmotique tel que le Pink test permet d'obtenir des performances très satisfaisantes.</p> <p>L'objectif de cette étude est donc de mettre en place la réalisation du Pink test au service d'hématologie biologique du CHRU de Nancy et d'analyser les résultats chez des patients suspects de sphérocytose héréditaire.</p>

Références bibliographiques	<p>Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, Marcello AP, Porretti L, Cortelezzi A, Barcellini W, Zanella A. Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics. <i>Haematologica</i>. 2012 Apr;97(4):516-23.</p> <p>King MJ, Garçon L, Hoyer JD, Iolascon A, Picard V, Stewart G, Bianchi P, Lee SH, Zanella A; International Council for Standardization in Haematology. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. <i>Int J Lab Hematol</i>. 2015 Jun;37(3):304-25.</p> <p>Vettore L, Zanella A, Molaro GL, De Matteis MC, Pavesi M, Mariani M. A new test for the laboratory diagnosis of spherocytosis. <i>Acta Haematol</i>. 1984;72(4):258–63.</p>
Objectifs principal *	<p><i>Objectif principal :</i></p> <p>Evaluer les performances diagnostiques du Pink Test dans le diagnostic de sphérocytose héréditaire</p>
Objectifs secondaires *	<p><i>Objectifs secondaires :</i> Réaliser une étude médico-économique quant à l'utilisation de ce test au laboratoire</p>
Critères de Jugement Principal *Et secondaires *	<p>Principal : Sensibilité, Spécificité, Répétabilité, Reproductibilité</p> <p>Secondaire : évaluation du temps technicien, coût des réactifs utilisés</p>
Schéma Général de l'étude *	<p>Il s'agit d'une étude monocentrique prospective réalisée avec les échantillons sanguins parvenant au service d'hématologie biologique dans le cadre du soin.</p> <p>Pour chaque patient chez qui une sphérocytose héréditaire est évoquée, le Pink test sera réalisé parallèlement au(x) test(s) utilisés dans la stratégie actuelle, test EMA au CHRU de Nancy +/- éktacytométrie réalisée au CHRU de Bicêtre.</p>

	<p>De plus, chez les patients porteurs connus de SH, le Pink test sera réalisé parallèlement à l'hémogramme réalisé dans le cadre du suivi de la maladie au CHRU de Nancy ;</p> <p>Cette étude ne nécessite donc aucun suivi des patients.</p>
Population, échantillonnage *	<p>Patients connus ou suspects de sphérocytose héréditaire chez qui un examen biologique est prévu ou a été réalisé avant le début de l'étude. (Hémogramme, et/ou test EMA et/ou érythrocytométrie)</p>
Nombre de sujets PREVUS (patients, témoins) Justification *	<p>30 patients atteints de SH</p>
Nature, origine des données, support et circuit des données	<p>Données recueillies pour la recherche : âge, données de l'automate XN 9000 : hémoglobine, hémocrite, VGM, CCMH, TCMH et autres paramètres de recherche, résultats EMA, résultat Pink test, diagnostic clinique (DX care), Résultats des examens biologiques complémentaires (hématologie, biochimie)</p> <p>Données recueillies pour la table de correspondance : date de naissance, numéro de dossier, initiales du nom et du prénom</p> <p>Support de recueil de données électroniques e-CRF</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Circuit des données : 2. Les données, issues des logiciels DX Care et GLIMs seront colligées dans un fichier Excel qui sera stocké sur le serveur du CHRU de Nancy <p>Messagerie et plateforme sécurisées, personnels du laboratoire</p> <p>Le responsable sera Docteur Perrin Julien.</p> <p>Réalisation d'une table de correspondance (classée dans un endroit différent où se trouve le tableur Excel des données patients) permettant de faire la correspondance entre les données de l'étude et l'identité complète du patient.</p>

Analyses statistiques *	Calcul Sensibilité – spécificité – valeur prédictive positive et négative.
Des personnes spécialement protégées, sont-elles concernées par votre recherche <input type="checkbox"/> Non <input checked="" type="checkbox"/> Oui, précisez dans le cadre ci-contre	<input checked="" type="checkbox"/> Femmes enceintes, parturientes ou mères qui allaitent <input type="checkbox"/> Personnes privées de liberté par une décision judiciaire ou administrative <input type="checkbox"/> Personnes faisant l'objet de soins psychiatriques <input type="checkbox"/> Personnes séjournant dans un établissement sanitaire ou social à d'autres fins que celles de la recherche <input checked="" type="checkbox"/> Personnes mineures (non émancipées) : attention modalités d'information particulière <input type="checkbox"/> Personnes majeures faisant l'objet d'une mesure de protection légale (tutelle, curatelle, sauvegarde de justice) : attention modalités d'information particulière <input type="checkbox"/> Personnes hors d'état d'exprimer leur consentement et qui ne font pas l'objet d'une mesure de protection juridique : attention modalités d'information particulière Le protocole devra justifier que l'on ne peut pas inclure d'autres personnes
Modalités d'information et de recueil du consentement / de la non-opposition des sujets	Livret d'accueil du CHRU de Nancy
Durées	Recueil de données de février 2018 à octobre 2019 Soit 18 mois Durée totale (temps d'analyse des données compris) : 2 ans
Besoins logistiques	NA
Financement	NA
Résultats/bénéfices éventuels attendus	La validation des performances du Pink test permettra l'amélioration de la stratégie diagnostique de la sphérocytose héréditaire au CHRU de Nancy

Flux des données



DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 19 octobre 2020

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>Présenté par : Olivia HAJJAR</p> <p><u>Sujet</u> : Optimisation du diagnostic de sphérocytose héréditaire au laboratoire d'hématologie biologique du CHRU de Nancy</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Mme. Béatrice FAIVRE, Professeur Directeur : M. Julien PERRIN, Maître de conférences Juges : M. JY. JOUZEAU, Professeur Mme. Delphine GERARD, Assistante des hôpitaux</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 14 sept 2020</p> <p align="center">Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p align="center">M. B. FAIVRE M. PERRIN</p>  
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 29.09.2020</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center">Pr. Raphaël DUVAL</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 29 SEP. 2020</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center">Pierre MUTZENHARDT</p> <p align="center">N° d'enregistrement : 11422C</p>

N° d'identification : 11422C

TITRE

Optimisation du diagnostic de sphérocytose héréditaire au laboratoire d'hématologie biologique du CHRU de Nancy

Thèse soutenue le 19 octobre 2020

Par Olivia HAJJAR

RESUME :

La sphérocytose héréditaire est la maladie constitutionnelle érythrocytaire en Europe du Nord et en Amérique du Nord avec une prévalence de 1/5000 naissances. Son diagnostic repose sur la clinique, les antécédents familiaux, la présence de sphérocytes sur le frottis sanguin et des tests de confirmation réalisés au laboratoire.

Au CHRU de Nancy, la stratégie diagnostique repose sur le test à l'éosine 5' maléimide (EMA) en complément de l'hémogramme et du frottis. Le test EMA, bien qu'ayant des performances diagnostiques satisfaisantes, pose quelques contraintes d'ordre technique et logistique. De plus, en termes d'interprétation, il existe une zone grise nécessitant le recours à l'ektacytométrie réalisée au centre de référence à Paris. En outre, les recommandations préconisent l'association de 2 tests (EMA et un test de fragilité osmotique). La question de mettre en place un test de fragilité osmotique au laboratoire s'est donc posée et notre choix s'est porté sur le pink test au vu des données rapportées dans la littérature.

L'objectif de ce travail s'inscrit dans une démarche d'amélioration de réalisation des tests pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire, afin de lever certaines contraintes techniques liées à l'EMA et d'évaluer le pink test et sa place dans la stratégie.

Cette étude a été réalisée sur une cohorte de 29 patients sphérocytaires et sur 133 patients sains. Ce travail a permis d'alléger le protocole de l'EMA en diminuant le nombre de lavages (pré et post-marquage) et le nombre de tubes par patient et par témoin avec un gain de temps significatif. L'évaluation du pink test a confirmé les bonnes performances rapportées dans la littérature ; permettant de proposer un arbre décisionnel de réalisation des tests, plaçant le pink test en 1^{ère} intention.

MOTS CLES : Sphérocytose héréditaire, maladie de Minkowski-Chauffard, anémie hémolytique congénitale, éosine-5'-maleimide, pink test, fragilité osmotique

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr Julien PERRIN, MCU-PH	Service d'hématologie biologique CHRU Nancy Faculté de Pharmacie Université de Lorraine	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique
		Thème <input checked="" type="checkbox"/> 5

Thèmes	1 – Sciences fondamentales 3 – Médicament <input checked="" type="checkbox"/> 5 – Biologie	2 – Hygiène/Environnement 4 – Alimentation – Nutrition 6 – Pratique professionnelle
--------	--	---