

# 02

## Globules rouges et fer

### 02-01 Intérêt du séquençage du gène *PIEZO1* dans les polyglobulies idiopathiques

M. Grenier<sup>\*1</sup>, M. Filser<sup>2</sup>, P. Aguilar-Martinez<sup>3</sup>, M. Giansily-Blaizot<sup>4</sup>, S. Egée<sup>5</sup>, B. Gardie<sup>6</sup>, S. Bezieau<sup>7</sup>, C. Garrec<sup>8</sup>, F. Airaud<sup>9</sup>, V. Picard<sup>10</sup>, B. Aral<sup>11</sup>, F. Girodon<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hématologie Biologique, Centre hospitalier universitaire F. Mitterrand Dijon-Bourgogne, Dijon ; <sup>2</sup> Hématologie biologique, CHU DIJON, Dijon ; <sup>3</sup> Laboratoire d'hématologie, Saint Eloi, Montpellier ; <sup>4</sup> département d'hématologie biologique, Saint Eloi, Montpellier ; <sup>5</sup> Équipe physiologie comparée des érythrocytes, UMR8227 -CNRS-Université Pierre et Marie Curie, Roscoff ; <sup>6</sup> Laboratoire de biologie et de pharmacologie appliquée (Ibpa), CNRS-ENS de Cachan, LabEx LERMIT, Cachan ; <sup>7</sup> Génétique, Hôtel-Dieu, Nantes ; <sup>8</sup> Génétique médicale, CHU Hôtel-Dieu, Nantes ; <sup>9</sup> CHU Nantes, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Nantes ; <sup>10</sup> Hématologie biologique, Hôpital Bicêtre, GH Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre ; <sup>11</sup> Labo génétique chromosomique moléculaire, CHU DIJON, Dijon

**Introduction.** Les polyglobulies sont caractérisées par une augmentation du volume globulaire total. Les étiologies sont variées et le diagnostic est dans la majorité des cas établi assez facilement. Dans certains cas, l'origine de la polyglobulie ne peut cependant pas être identifiée et l'on parle alors de polyglobulie idiopathique. L'utilisation récente du séquençage de nouvelle génération (NGS) en a facilité l'exploration. Ainsi, une étiologie est retrouvée dans environ 25 % des cas, essentiellement en lien avec une anomalie des gènes impliqués dans la régulation de l'hypoxie. Récemment, des mutations gain de fonction du gène *PIEZO1* codant le canal cationique *PIEZO1* présent sur la membrane du globule rouge et impliqué dans l'homéostasie cellulaire, ont été rapportées et associées aux stomatocytoses héréditaires ou xérocytoses héréditaires (XH). Certaines formes étaient paradoxalement associées à une polyglobulie.

L'objectif de notre travail a été de rechercher dans une cohorte de patients porteurs de polyglobulies idiopathiques d'éventuels variants pathogènes du gène *PIEZO1*.

**Patients et méthodes.** Une analyse NGS (Capture en Sure-Select QXT<sup>®</sup> Agilent, Séquençage Illumina) a été réalisée sur les gènes impliqués dans les stomatocytoses (*PIEZO1*, *KCNN4*, *SLC4A1* et *RHAG*) chez 113 patients présentant une polyglobulie idiopathique sans variation pathogène sur les gènes *EPOR*, *JAK2*, *HIF1-2-3*, *PHD1-2-3*, *VHL*, *SH2B3*.

**Résultats.** Le gène *PIEZO1* étant très polymorphe, de nombreux variants dont plusieurs de signification clinique indéterminée (classe 3 selon la classification ACMG) ont été identifiés dans la cohorte étudiée. Toutefois six patients (5,3 %) présentaient des mutations d'intérêt (classe 4 ou 5) à l'état hétérozygote : cinq avaient des variants précédemment décrits dans la littérature comme étant pathogènes et pour certains testés fonctionnellement (Arg2110Trp, Thr2127Met) : deux patients présentaient la mutation Arg2110Trp, deux présentaient la mutation Lys2502Arg. Le variant Thr2127Met précédemment rapporté comme pathogène a été retrouvé chez un patient. Un nouveau variant, Ile2462Met a été mis en évidence, localisé à proximité d'une zone où des variants pathogènes du gène *PIEZO1* ont déjà été décrits. Pour ces deux derniers patients les profils clinicobiologiques sont très évocateurs de XH avec une surcharge en fer, un nombre élevé de réticulocytes, une CCMH élevée, une P50 diminuée et un profil éktyctométrique en faveur du diagnostic.

**Conclusion.** Des variants de *PIEZO1* ont été retrouvés dans un nombre non négligeable de polyglobulies idiopathiques (un peu plus de 5 % dans notre cohorte), et permettent de porter le diagnostic de XH, associés à des manifestations clinicobiologiques caractéristiques. Le gène *PIEZO1* doit désormais faire partie des panels d'exploration des polyglobulies idiopathiques.

### 02-02 Profil métabolomique des xérocytoses héréditaires et conséquences fonctionnelles sur l'affinité hémoglobine-oxygène

L. Kiger<sup>1</sup>, L. Oliveira<sup>2</sup>, C. Guitton<sup>3</sup>, F. Fenaille<sup>4</sup>, C. Junot<sup>5</sup>, K. Ghazal<sup>6</sup>, PH. Romeo<sup>7</sup>, L. Garçon<sup>8</sup>, V. Picard<sup>\*9</sup>

<sup>1</sup> Inserm, unité 779 université paris xi, IMRB-U955, Équipe 2 émergente : Transfusion et maladies du globule rouge, Institut Mondor, Créteil ; <sup>2</sup> UMR 1274, GrEX, CEA, INRA, Université Paris Saclay, Fontenay aux Roses ; <sup>3</sup> Service de pédiatrie générale, filière McGre, hôpital Bicêtre, GHU Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre ; <sup>4</sup> Pharmacologie et d'immunoanalyse, laboratoire

d'étude du métabolisme des médicaments Metabohub, CEA, INRA, Université Paris Saclay, Gif-sur-Yvette ; <sup>5</sup> Pharmacologie-immunoanalyse, DRF/iBiTec-S, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette ; <sup>6</sup> Biochimie, Hôpital Bicêtre (AP-HP), Le Kremlin-Bicêtre ; <sup>7</sup> UMR 1274, LRTS/iRCM/IBFJ/DRF/CEA, Fontenay aux roses ; <sup>8</sup> Laboratoire d'hématologie, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, et EA4666, UPJV, CHU Amiens ; <sup>9</sup> Hématologie biologique, Hôpital Bicêtre, GH Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre, Faculté de Pharmacie, Univ Paris Saclay

**Introduction.** Les xérocytoses héréditaires (XH) sont des hémolyses constitutionnelles rares, secondaires dans la majorité des cas à des mutations "gain de fonction" du gène codant pour le mécano-transducteur *PIEZO1*, plus rarement, à des mutations du gène codant pour le canal Gardos. L'étude d'une série de 126 patients présentant une XH a montré que dans les formes *PIEZO1*, l'atteinte hématologique est moins sévère, avec, le plus souvent, une hémolyse compensée voire une polyglobulie et une déshydratation érythrocytaire plus marquée. La physiopathologie de ces pathologies n'est pas totalement élucidée.

**Patients et méthodes.** Nous avons utilisé une approche métabolomique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution permettant une étude globale des composés de petits poids moléculaires au sein des érythrocytes. Nous avons comparé le métabolome issu des globules rouges de neuf patients avec XH, parmi lesquels huit patients avec mutations *PIEZO1* et de 10 témoins analysés dans les mêmes conditions. Nous avons évalué la p50 par calcul à partir des gaz du sang veineux (Radiometer) ou par mesure directe au moyen d'un analyseur Hemox.

**Résultats.** L'analyse supervisée a montré une bonne séparation entre XH et témoins, et isolé 19 métabolites discriminants parmi les 127 identifiés. Trois métabolites étaient significativement surexprimés dans les XH : AMP, acide caproïque et N-acétyl hexosamine. Les 12 autres étaient sous-exprimés dont les sept métabolites intermédiaires de la glycolyse anaérobie, alors que le pyruvate n'était pas différentiel. Enfin, nous avons observé une diminution parallèle du 2,3-diphosphoglycérate (2,3 DPG) dans les globules rouges de XH. Nous avons confirmé ces données par mesure directe du 2,3 DPG dans les GR de sept patients avec mutation *PIEZO1*, de quatre patients avec hémolyse autre (trois sphérocytoses héréditaires, un déficit en pyruvate kinase) et quatre témoins. Nous avons observé une diminution significative du ratio molaire 2,3 DPG/Hémoglobine chez les patients XH par rapport à tous les autres. Nous avons enfin étudié les conséquences de cette baisse du 2,3 DPG sur l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Nous avons évalué la p50 par calcul à partir des gaz du sang veineux ou par mesure directe au moyen d'un analyseur Hemox et observé une diminution significative de la p50 chez les patients HX alors que la p50 était normale chez les contrôles, indiquant une relative augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène chez les patients HX.

**Conclusion.** En conclusion, l'analyse métabolomique a permis d'identifier une signature érythrocytaire « HX », avec, en particulier, une diminution significative des métabolites de la glycolyse dont le 2,3 DPG. Nous proposons l'hypothèse d'une glycolyse augmentée afin d'assurer une production maximale d'ATP nécessaire au fonctionnement des pompes membranaires s'opposant à la fuite de cations. La baisse du 2,3 DPG a pour conséquence une augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, susceptible d'entraîner une relative hypoxie tissulaire. Ces nouvelles données permettent d'éclairer la physiopathologie de la XH : en effet, nous proposons que le tableau d'hémolyse compensée et quelquefois de polyglobulie, observé dans les XH mutées *PIEZO1* résulte d'un équilibre entre d'une part l'hémolyse liée à la déshydratation érythrocytaire et d'autre part une stimulation de l'érythropoïèse générée par l'hypoxie.

### 02-03 *MMS22L* : un nouveau gène clé de l'érythropoïèse

E. Colin<sup>\*1</sup>, G. Courtois<sup>2</sup>, F. Guillem<sup>2</sup>, L. Da Costa<sup>3</sup>, J. Galimand<sup>3</sup>, C. Lefevre<sup>4</sup>, D. Rizzo<sup>5</sup>, J. Abraham<sup>6</sup>, S. Moreau<sup>7</sup>, M. Delous<sup>8</sup>, S. Fabrega<sup>9</sup>, C. Brouzes<sup>10</sup>, P. Mayeux<sup>11</sup>, L. Maouche-Chrétiens<sup>1</sup>, O. Hermine<sup>12</sup>, L. Couronné<sup>1</sup>

<sup>1</sup> U1163, Institut Imagine, Paris ; <sup>2</sup> U1163, Labex GR-EX, Institut Imagine, Paris ; <sup>3</sup> Service d'hématologie biologique, Hôpital Robert-Debré, Paris ; <sup>4</sup> Inserm U1016-CNRS UMR8104-université Paris Descartes -Labex GR-EX, Institut Cochin, Paris ; <sup>5</sup> Hématologie biologique, CHU de Limoges Dupuytren, Limoges ; <sup>6</sup> CHU, Service Hématologie Clinique, Limoges ;

<sup>7</sup> Hématologie, CHU Limoges Hôpital Dupuytren, Limoges ; <sup>8</sup> Laboratory of Hereditary Kidney Diseases, Inserm, institut Imagine, Paris ; <sup>9</sup> Plateforme vecteurs viraux et transfert de gènes, IFR94, Hôpital Necker, Paris ; <sup>10</sup> Laboratoire d'hématologie, Hôpital Necker, Paris ; <sup>11</sup> Inserm U1016, CNRS UMR 8104, université Paris Descartes, Labex GR-EX, Institut Cochin, Paris ; <sup>12</sup> Hématologie, Hôpital Necker, Paris

**Introduction.** Le développement de techniques de séquençage à haut débit a permis des avancées importantes dans la compréhension de l'érythropoïèse et des processus cellulaires pouvant la perturber. Cette stratégie apparaît particulièrement intéressante chez les patients porteurs d'anémies congénitales rares non caractérisées. Nous rapportons ici le cas d'une patiente adulte présentant une érythroblastopénie d'origine intrinsèque associée à des signes extra-hématologiques et pour laquelle aucun diagnostic n'avait pu être posé. Grâce au séquençage d'exome, nous avons identifié une mutation hétérozygote dans le gène *CDAN1* (R725W), déjà décrite dans l'anémie dysérythropoïétique congénitale de type 1 (CDA-1). Cependant, la présence de cette mutation chez son frère non atteint, suggérait qu'elle ne suffisait pas à elle seule à expliquer le phénotype. En accord avec cette hypothèse, nous avons détecté, chez la patiente uniquement, une mutation germinale additionnelle hétérozygote dans le gène *MMS22L* (Q732X). *MMS22L* est une protéine impliquée dans la réparation par recombinaison homologue des fourches de réplifications endommagées ou bloquées. Son recrutement au niveau des fourches de répllication dépend de la protéine histone chaperonne ASF1. De façon intéressante, ASF1 est régulée négativement par *CDAN1* qui la séquestre dans cytoplasme. L'analyse de différentes bases de données a permis d'identifier un seul autre cas présentant une mutation hétérozygote inactivatrice de *MMS22L* mais sans phénotype érythroïde associé. Nous émettons donc l'hypothèse que des anomalies combinées de *MMS22L* et *CDAN1* seraient responsables de l'anémie chez le cas index.

**Résultats.** Nous avons d'abord analysé l'effet de l'haplo-insuffisance combinée de *CDAN1* et de *MMS22L* sur l'érythropoïèse *in vivo* dans un modèle de poisson-zèbre. *Cdan1* et *mms22l* ont été inactivés d'environ 50 %, séparément ou simultanément par injection de morpholinos au stade une cellule. Les poissons inactivés simultanément pour *mms22l* et *cdan1* étaient profondément anémiques, contrairement à ceux inactivés pour l'un ou l'autre des gènes. Ces données suggèrent que le phénotype observé chez la patiente serait dû à l'effet combiné des mutations de *MMS22L* et de *CDAN1*. Par ailleurs, des expériences préliminaires *in vitro* indiquent que l'inhibition de l'expression de *CDAN1* induirait une diminution d'expression de *MMS22L*.

*MMS22L* n'ayant jamais été étudié dans l'érythropoïèse, nous avons ensuite analysé les conséquences de son inactivation complète par shARN aux stades CD34+ et CD36+, dans un modèle d'érythropoïèse humaine *in vitro*. Cela a résulté en un arrêt de la prolifération lié à un blocage du cycle cellulaire en phase G1, ayant pour conséquence un arrêt de la différenciation. De façon intéressante, ce phénotype n'a pas été observé lors de l'inactivation de *MMS22L* dans le lignage granulomacrophagique.

**Conclusion.** Au total, nous démontrons pour la première fois que *MMS22L*, un régulateur du cycle cellulaire, est indispensable à la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes. Ses interactions avec *CDAN1*, qui sont en cours d'investigation, apportent de nouveaux éléments à la compréhension de la physiopathologie des CDA-1. Nos données soulignent également le potentiel oligogénisme de certaines anémies rares inexplicables et incitent donc à réaliser un séquençage d'exome ou de génome complet dans ce contexte.

#### 02-04 Un nouveau rôle de la glutathion peroxydase 4 dans l'énucléation des érythroblastes humains

H. Ouled-Haddou<sup>1</sup>, K. Messaoudi<sup>1</sup>, R. Lopes Dos Santos<sup>1</sup>, C. Candice<sup>1</sup>, N. Jankovsky<sup>1</sup>, A. Caulier<sup>2</sup>, D. Lebon<sup>3</sup>, P. Vong<sup>4</sup>, J. Platon<sup>1</sup>, Y. Demont<sup>4</sup>, J. Demagny<sup>4</sup>, N. Guillaume<sup>1</sup>, JP. Marolleau<sup>5</sup>, J. Rochette<sup>6</sup>, L. Garçon<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Centre universitaire de recherche en santé CURS EA4666, Université de Picardie Jules Verne, Amiens ; <sup>2</sup> Maladies du sang, CHU Amiens, Amiens Cedex ; <sup>3</sup> Hématologie clinique, CHU Amiens, Amiens ; <sup>4</sup> Laboratoire d'hématologie, CHU Amiens-Picardie, Amiens ; <sup>5</sup> Maladies du sang, CHU Amiens, Amiens ; <sup>6</sup> Laboratoire de génétique moléculaire, CHU d'Amiens, Amiens

**Introduction.** Les enzymes glutathion peroxydase (GPX) font partie du système de protection contre la peroxydation lipidique. Parmi elles, GPX4 est la seule sélénoprotéine capable de réduire directement à la membrane les acides gras oxydés et le cholestérol. Des travaux récents ont identifié GPX4 comme inhibiteur central de la ferroptose. GPX4 a récemment été impliquée dans l'érythropoïèse murine : l'inactivation de GPX4 induit une anémie hémolytique et un taux d'apoptose élevé dans les progéniteurs spléniques. Le rôle de GPX4 n'a jusqu'à présent pas été décrit dans l'érythropoïèse humaine.

**Résultats.** En utilisant un protocole de différenciation *in vitro* à partir de cellules PBMC-CD34+ humaines, nous avons observé une induction de l'expression de GPX4 en ARN et protéine au cours de la différenciation érythroïde. RSL3, un inhibiteur spécifique de GPX4, n'a pas affecté la différenciation précoce mais a conduit à une diminution du taux d'énucléation évalué par marquage Hoechst (35 % ± 6 vs. 74 % ± 9, p < 0,01) et par cytologie (27 % vs. 58 % ± 10, p < 0,05). Cet effet est indépendant de la ferroptose puisque (i) FIN56 et érastine, deux activateurs de ferroptose n'agissant pas directement sur GPX4, n'ont pas d'impact sur l'énucléation et (ii) le défaut d'énucléation n'est pas réverté par les inhibiteurs de ferroptose. Par Western Blot, nous avons observé que RSL3 induisait une déplétion de GPX4 dans les progéniteurs érythroïdes. Afin de confirmer que le défaut d'énucléation était lié à cette diminution de GPX4, nous avons utilisé une stratégie de knock-down par transduction lentivirale de Sh-RNA. Nous avons confirmé le défaut d'énucléation terminale dans les cellules transduites par les lentivirus shGPX4. L'isopentylpyrophosphate, un composant intermédiaire de la synthèse du cholestérol qui agit également comme substrat de la synthèse des sélénoprotéines, restaure à la fois l'expression protéique de GPX4 et l'énucléation des érythroblastes. Nous avons donc cherché à savoir si le knock-down de GPX4 affectait la teneur en lipides membranaires. L'ajout de cholestérol dans le milieu rétablit partiellement le taux d'énucléation mais l'étude lipidomique n'a pas montré de différence significative dans la teneur totale en lipides membranaires (et particulièrement en cholestérol) après exposition au RSL3. Nous avons donc évoqué une répartition anormale du cholestérol au sein de la membrane érythrocytaire. Le cholestérol étant particulièrement abondant dans les radeaux lipidiques, nous avons étudié par cytométrie en flux et immunofluorescence l'expression de la toxine cholérique, marqueur des radeaux lipidiques et avons observé une diminution de 60 % ± 12 de son intensité moyenne de fluorescence après exposition à RSL3, reflétant une diminution de la formation des radeaux lipidiques. Ces derniers jouant un rôle dans l'accrochage de l'anneau contractile qui sépare pyrénoocytes et réticulocytes, nous avons étudié la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, impliquée dans cet anneau et avons constaté que celle-ci diminuait significativement dans les conditions de knock-down de GPX4.

**Conclusion.** Nous avons identifié GPX4 comme nouvel acteur de la différenciation érythroïde terminale humaine, indépendamment de sa fonction dans le contrôle de la ferroptose. Nous avons décrit son implication à la surface de l'érythroblaste dans la formation des radeaux lipidiques nécessaires à l'assemblage de l'anneau contractile et à la cytokinèse menant à l'extrusion du noyau.

#### 02-05 Génération et caractérisation de KY1066, un anticorps humanisé ciblant l'activité enzymatique de la matriptase-2 pour le traitement de la surcharge en fer dans la $\beta$ -thalassémie

M. Wake<sup>1</sup>, J. Papworth<sup>1</sup>, L. Bayliss<sup>1</sup>, B. Grimshaw<sup>1</sup>, N. Rynkiewicz<sup>1</sup>, J. Paterson<sup>1</sup>, A. Poindron<sup>1</sup>, E. Spearing<sup>1</sup>, E. Carter<sup>1</sup>, R. Hudson<sup>1</sup>, V. Petzer<sup>2</sup>, A. Largounez<sup>3</sup>, A. Belot<sup>3</sup>, A. Palin<sup>3</sup>, I. Theurl<sup>2</sup>, V. Germaschewski<sup>4</sup>, D. Meynard<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup> Kymab Ltd, Cambridge, Royaume Uni ; <sup>2</sup> Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Autriche ; <sup>3</sup> IRSD U1220, Toulouse ; <sup>4</sup> Kymab Ltd., Cambridge, Royaume Uni ; <sup>5</sup> IRSD U1220, Toulouse

**Introduction.** La  $\beta$ -thalassémie est une hémoglobinopathie héréditaire causée par des mutations du gène de la  $\beta$ -globine et caractérisée par une érythropoïèse inefficace, une surcharge en fer, une splénomégalie et une anémie. Une production excessive d'EPO, résultant de l'anémie, inhibe l'hepcidine, entraînant une augmentation de l'absorption du fer par l'intestin et une libération des réserves internes. Cela entraîne une surcharge en fer tissulaire chez les patients indépendants de la transfusion (NTDT) et exacerbe la situation chez les patients dépendants de la transfusion (TDT). Le traitement pour les patients TDT implique des transfusions sanguines entraînant une surcharge en fer secondaire, qui nécessite un traitement avec des chélateurs du fer. Bien que les chélateurs aient amélioré le pronostic des patients TDT, la surcharge en fer représente toujours un besoin clinique non satisfait. Le rôle de la matriptase-2 (MT2) dans la régulation du fer est déjà bien établi et il a été démontré que la réduction de l'expression de la MT2 augmente l'expression de l'hepcidine, corrigeant la surcharge en fer, la splénomégalie et l'anémie chez les souris *Hbbth3/+*. La  $\beta$ -thalassémie est une hémoglobinopathie héréditaire causée par des mutations du gène de la  $\beta$ -globine et caractérisée par une érythropoïèse inefficace, une surcharge en fer, une splénomégalie et une anémie. Une production excessive d'EPO, résultant de l'anémie, a un effet suppressif sur l'hepcidine, entraînant une augmentation de l'absorption du fer par l'intestin et une libération des réserves internes. Cela entraîne une surcharge en fer tissulaire chez les patients indépendants de la transfusion (NTDT) et exacerbe la situation chez les patients dépendants de la transfusion (TDT). Le traitement de référence standard pour les patients TDT implique des transfusions sanguines régulières entraînant une surcharge en fer secondaire et des dommages aux tissus causés par le fer non lié à la transferrine (NTBI), qui nécessite un traitement chélateur du fer.

Bien que les chélation du fer aient amélioré le pronostic des patients TDT, la surcharge en fer représente toujours un besoin clinique non satisfait. Le rôle de la matriptase-2 (MT2) dans la régulation du fer est déjà bien établi et il a été démontré que la réduction de l'expression de la MT2 augmentait l'expression de l'hepcidine, corrigeant la surcharge en fer, la splénomégalie et l'anémie chez les souris *Hbbth3/+*.

**Résultats.** Dans cette étude, nous décrivons un anticorps ciblant le MT2, KY1066, pour le traitement des maladies de surcharge en fer, telles que la  $\beta$ -thalassémie. Grâce à l'immunisation de souris transgéniques pour les régions variables de chaînes lourdes et légères d'immunoglobuline humaine avec le domaine protéasique de la MT2 humaine, nous avons pu obtenir des anticorps monoclonaux spécifiques. KY1066, s'est avérée être un neutralisant à réactivité croisée de l'activité enzymatique MT2 humaine et murine. En conséquence, il a été constaté qu'il augmentait la signalisation BMP/SMAD, élevait l'expression de l'hepcidine dans le foie, et diminuait le fer sérique après une seule I.P. (10 mg/kg) chez les souris. Chez les souris *Hbbth3/+*, un traitement de huit semaines permet de corriger la surcharge en fer, d'améliorer l'anémie et la splénomégalie. De plus, en combinaison avec des doses répétées d'EPO, l'anémie est encore plus corrigée.

**Conclusion.** Cette étude indique que KY1066 a le potentiel de traiter les patients surchargés en fer, comme dans la  $\beta$ -thalassémie, pour améliorer l'anémie et réduire les besoins en chélation.

### 02-03 Les microparticules dérivées des globules rouges infectés par *Plasmodium falciparum* sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie de l'ATP extracellulaire

CL. Alvarez<sup>1</sup>, MV. Espelt<sup>1</sup>, JP. Semblat<sup>2</sup>, C. Lapoumeroulie<sup>2</sup>, C. Hattab<sup>2</sup>, S. Repetto<sup>3</sup>, VHM. Barbieri<sup>4</sup>, DA. Gonzalez<sup>4</sup>, MA. Ostuni<sup>5</sup>, PJ. Schwarzbaum<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Iquifib, Conicet, Buenos Aires, Argentine ; <sup>2</sup> UMR\_s1134, Institut national de transfusion sanguine, Paris ; <sup>3</sup> INPAM, Conicet, Buenos Aires, Argentine ; <sup>4</sup> Catedra de Biofísica, Foub, université de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentine ; <sup>5</sup> UMR\_s1134, Université de Paris, Paris

**Introduction.** Il a été démontré que les globules rouges (GR) infectés par *P. falciparum* produisent des microparticules (MP) de 0,1-1  $\mu$ m à partir de la membrane plasmique. Lors de la formation des MP, celles-ci peuvent retenir l'ATP qui peut alors être libérée en réponse aux différents stimuli. L'ATP extracellulaire (ATPe) qui en résulte est impliqué dans la régulation de la vasodilatation. Il a été décrit que les patients atteints de paludisme présentent des troubles microcirculatoires qui semblent associés à une altération de l'homéostasie de l'ATPe. Comme la régulation de l'ATPe des GR infectés dépend de l'équilibre entre l'activité de l'ATPase et la libération de l'ATP, cet équilibre pourrait être altéré par la production de MP, qui présentent leur propre capacité de régulation de l'ATPe. L'objectif de cette étude était de déterminer si les MP peuvent contribuer à l'homéostasie de l'ATPe des globules rouges infectés par *P. falciparum*.

**Matériels et méthodes.** Des étapes séquentielles de centrifugation ont été effectuées pour obtenir des MP à partir d'une suspension d'érythrocytes infectés par *P. falciparum* (MP P) ou d'une suspension d'érythrocytes non infectés (MP C).

La mesure de l'accumulation d'ATPe a été effectuée au moyen de la réaction luciférase-luciférase. Des MP provenant de cultures infectées ou non infectées ont été placés dans la chambre du luminomètre contenant 0,01  $\mu$ M de luciférase, 0,2 mM de luciférase et 0,1 mg/mL de Coenzyme A. Après perméabilisation avec de la digitonine (50  $\mu$ g/mL), l'évolution temporelle de l'émission lumineuse a été transformée en concentration d'ATPe en fonction du temps à l'aide d'une courbe d'étalonnage d'ATP (variant de un à 50  $\mu$ M).

Pour évaluer la capacité des MP à hydrolyser l'ATPe (activité ectoATPase), de l'ATP exogène (450-1 800 nM) a été ajouté à des suspensions de MP, obtenues à partir de cultures infectées ou non infectées, dans la réaction luciférase-luciférase. Une fonction exponentielle a été ajustée à la cinétique expérimentale de l'ATP. L'activité de l'ectoATPase a été dérivée des pentes des courbes de désintégration de l'ATPe. Les valeurs initiales du taux d'ATPe présentaient une fonction linéaire avec [ATPe]<sub>s</sub>, à partir de laquelle K ATP représentait la pente.

**Résultats.** L'infection des globules rouges par *P. falciparum* a déclenché la formation de PM arrondies submicrométriques, qui ont pu retenir l'ATP. Les MP sont capables d'hydrolyser de l'ATPe dans l'ordre nM ; l'hydrolyse de l'ATPe par les MP était significativement plus élevée quand les MP sont obtenues à partir d'une culture d'érythrocytes infectés que lorsqu'elles étaient produites à partir d'érythrocytes témoins.

**Conclusion.** Ces résultats sont cohérents à ceux d'un rapport précédent, qui montrait que les GR infectés à différents stades du cycle de vie intra-érythrocytaire (anneau, trophozoïtes et schizontes) présentaient une activité ectoATPase plus élevée que les GR non infectés. Ainsi, une hydrolyse plus élevée de l'ATPe devrait déclencher une accumulation de produits métaboliques qui peuvent activer différents sous-types de récepteurs purinergiques. En effet, les produits dérivés de l'hydrolyse de l'ATP (ADP, AMP et adénosine) peuvent s'accumuler dans le milieu

extracellulaire et activer les récepteurs purinergiques spécifiques et/ou participer aux mécanismes de récupération de la purine. Nous étudions actuellement les conséquences de la signalisation de cette activité hydrolytique élevée.

### 02-07 Sémiologie clinique de l'anémie chez des patients âgés de plus de 75 ans : une étude prospective menée par le groupe SiFMI

AA. Zulfiqar<sup>1</sup>, N. Lorenzo-Villalba<sup>2</sup>, H. Ben Malek<sup>3</sup>, T. Vogel<sup>4</sup>, E. Andres<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Service de Médecine Interne-Gériatrie-Thérapeutique, CHU Rouen Saint-Julien, Rouen ; <sup>2</sup> Département de médecine interne, CHRU Strasbourg, Stras ; <sup>3</sup> Médecine interne, CHU de Strasbourg, Strasbourg ; <sup>4</sup> Gériatrie et médecine interne, CHRU Hôpitaux Universitaires Strasbourg, Strasbourg ; <sup>5</sup> Service de médecine interne, CHU de Strasbourg, Strasbourg

**Introduction.** L'anémie reste une des préoccupations majeures du quotidien de l'Interniste et de l'Hématologue, puisque classée troisième parmi les pathologies prises en charge dans les services de médecine interne. Il a semblé opportun au groupe SiFMI (situations fréquentes en médecine interne) de la Société nationale française de médecine interne (SNFMI) de s'attacher à l'étude des anémies au travers de l'apport au diagnostic de la sémiologie « classique » du syndrome anémique.

**Patients et méthodes.** Étude prospective, multicentrique, menée de septembre 2015 à septembre 2017, dans des services de médecine interne et de gériatrie.

**Résultats.** 204 sujets, âgés de 75 ans ou plus, ont été inclus par 10 services de Médecine Interne, Gériatrie ayant tous une activité reconnue dans le domaine de l'aval des Urgences. Les 204 patients ont été répartis en deux groupes, selon un appariement en 2/1 selon l'âge et le sexe : un groupe de 159 patients anémiés et un groupe de 45 patients non anémiés. L'âge moyen des patients était de 86,3  $\pm$  5,6 ans dans le groupe « anémié » et 84  $\pm$  5,7 ans dans le groupe « non anémié ». Le ratio F/Hest de 1,6. Au sein de la population de patients anémiés, 62,7 % d'entre eux ont une insuffisance cardiaque. Le motif d'hospitalisation était une infection pour 35,3 %. L'hospitalisation pour décompensation cardiaque n'intéressait que 11,8 % contre 46,1 % des sujets non anémiés. Le taux d'hémoglobine moyen était de 13,7  $\pm$  1,7 g/dL dans le groupe « non anémié » versus 10,6  $\pm$  1,3 g/dL dans le groupe « anémié ». L'anémie était principalement normocytaire, avec un premier quartile à 88 fl et un troisième quartile à 94,9 fl. 75 % des anémies de ce groupe présentaient une concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) normale. Le premier quartile était retrouvé à 31,9 g/dL (valeurs normales du CCMH : 31,5-36,5 g/dL). 25 % des valeurs de ferritinémie étaient inférieures à 100,8  $\mu$ g/L avec une médiane à 212  $\mu$ g/L. 75 % des sujets avaient un taux de vitamine B12 normal (valeurs normales : 0,22-1,10  $\mu$ g/L) et B9 (valeurs normales : > 5  $\mu$ g/L). Il apparaît que les différents paramètres suivants : asthénie, dyspnée de stade III et IV de la NYHA, palpitations, douleur thoracique, tachycardie, hypotension, mais également confusion, chute, dépression et MMSE, sont sans différence notable sur le plan statistique entre les deux groupes, à l'exception de la pâleur cutanéo-muqueuse, des œdèmes des membres inférieurs, du taux d'albuminémie et de l'ECG.

**Discussion.** Seuls quatre paramètres prédictifs étaient significativement associés à la présence d'une anémie. Nous retrouvons les non moins classiques « pâleur cutanéo-muqueuse » et « œdème des membres inférieurs ». Le « taux d'albumine » se retrouve être un facteur « protecteur » vis-à-vis de la présence d'une anémie. Nous imaginons assez aisément qu'une albuminémie basse signe un syndrome inflammatoire ou une dénutrition avec de potentielles carences et peut alors être associée à une anémie. De manière plus surprenante, la variable « ECG normal » apparaît au sein du modèle. Une proportion plus importante de sujets non anémiés admis pour décompensation cardiaque ou malaise et aux antécédents d'arythmie cardiaque, comparativement à la population de sujets anémiés, pourrait se révéler être une piste à creuser pour expliquer ce résultat.

**Conclusion.** Le diagnostic clinique de l'anémie au sein d'une population de sujets âgés s'avère être un vrai défi.

### 02-08 Mise en place d'une solution de gestion des interférences analytiques liées à la numération des érythrocytes sur l'hématimètre XN10 (SYSMEX®)

D. Gerard<sup>\*</sup>, S. Henry, S. Salignac, J. Perrin

Service d'hématologie biologique, CHU de Nancy - Hôpitaux de Brabois, Vandœuvre-lès-Nancy

**Introduction.** Au CHRU de Nancy, les hémogrammes sont réalisés dans le service d'hématologie biologique grâce aux hématimètres XN10 (Sysmex®). Des perturbations analytiques peuvent interférer dans la mesure et fausser les résultats. Les interférences spécifiques aux paramètres érythrocytaires sur les hématimètres XN10 sont quotidiennement rencontrées et nécessitent une détectabilité et une action corrective rapide pour garantir des résultats fiables pour la prise en charge des patients. En

pratique, de telles perturbations analytiques peuvent se détecter par une fausse diminution (< 32,0 g/dL) ou augmentation (> 36,5 g/dL) de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH). L'objectif de ce travail est de développer une méthode de détection des interférences et de correction rapide des paramètres érythrocytaires utilisant les paramètres supplémentaires fournis par la technologie Sysmex<sup>®</sup>, cette méthode devant être applicable en routine.

**Matériels et méthodes.** Pour ce faire, nous avons réalisé une analyse de risque bibliographique, puis identifié et constitué 11 groupes d'interférences à étudier, comprenant notamment la lactescence, l'ictère, ainsi que la présence d'agglutinines froides ou de sphérocytes. Un groupe contrôle (n = 2 234) fut également constitué pour vérifier la corrélation des paramètres érythrocytaires de routine (numération érythrocytaire, volume globulaire moyen et hémoglobine) vs supplémentaires (paramètres correspondant disponibles via un autre canal analytique). Une étude comparative des écarts entre les deux paramètres de numération érythrocytaire ( $\Delta$ RBC %) et de l'hémoglobine ( $\Delta$ HGB %) des différents groupes d'interférences par rapport au groupe contrôle a été réalisée afin de déterminer les différentes anomalies analytiques possibles pour chaque groupe. Des logigrammes de détection et de correction (physique ou mathématique) des interférences analytiques ont été développés pour la prise en charge de ces anomalies. Une étude rétrospective de cette méthode sur une banque de cas a enfin été réalisée.

**Résultats.** Pour le groupe contrôle, nous avons trouvé une bonne corrélation entre les paramètres de routine et les paramètres supplémentaires. Pour chacun des groupes d'interférences, différentes anomalies analytiques ont été retrouvées ; (exemple : hyperleucocytose et delta RBC %, interférences plasmatiques et delta HGB %, etc.). Avec ces résultats, deux logigrammes de prise en charge d'une CCMH < 32 g/dL et > 36,5 g/dL ont été développés afin de détecter et de corriger une éventuelle interférence. Leurs applications dans une étude rétrospective ont ensuite permis une correction de 97 % des 65 cas de la banque de cas d'interférences analytiques du CHRU de Nancy.

**Conclusion.** Ces deux logigrammes décisionnels intègrent une méthode de détection simple et rapide des interférences (basée sur la CCMH), et permettent de corriger efficacement les hémogrammes présentant une ou plusieurs interférences à partir des paramètres érythrocytaires supplémentaires fournis par d'autres canaux d'analyses de l'hématimètre XN10.

#### 02-09 Proximity ligation assay (PLA) couplé à l'imagerie en flux comme nouvel outil de l'analyse de défauts observés dans des pathologies de membrane du globule rouge

S. Rougé<sup>1</sup>, M. Dussiot<sup>2</sup>, S. Genetet<sup>1</sup>, M. Ostuni<sup>1</sup>, I. Mouro-Chanteloup<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Inserm U1134, Institut national de la transfusion sanguine (INTS), Paris ;

<sup>2</sup> Grex, Université Paris Descartes, Paris

**Introduction.** Les pathologies de membrane du globule rouge (GR) sont souvent associées à des défauts d'expression de protéines clés au sein de complexes multimoléculaires. Une protéine majeure de ces complexes est la stomatine qui est absente de la membrane des patients OHSt (*overhydrated stomatocytosis*) (1-2). Cette pathologie est caractérisée par un phénotype d'hyperhydratation du GR associé à des défauts de transports ioniques ainsi qu'une anémie hémolytique (3-4). Dans des systèmes non érythroïdes, l'interaction de la Stomatine avec des canaux ioniques est connue pour réguler leur activité, en particulier les interactions *Piezo-stomatin-like* (5) et pannexine-stomatine (6).

Dans le but de mieux comprendre l'origine de la fuite cationique observée en absence de Stomatine chez les patients OHSt, nous avons utilisé une technique permettant d'étudier l'interaction de la stomatine avec la Pannexine et Piezo-1 exprimés à la membrane du GR (7-8).

**Matériels et méthodes.** Nous avons adapté la technique de *proximity ligation assay* (PLA), approche utilisée pour mettre en évidence des interactions protéiques *in situ*, à l'étude de la membrane du GR.

Les protéines stomatine et pannexine sont marquées par des anticorps primaires d'espèces différentes et dirigés contre des épitopes intracellulaires, après perméabilisation des GR. Des anticorps secondaires couplés à des oligonucléotides complémentaires sont ajoutés, permettant les réactions de ligation, de polymérisation et de marquage (sondes fluoriscentes) quand les protéines sont proches (distance < 40 nm) (9). La détection est réalisée par imagerie en flux (ImageStream, Amnis<sup>®</sup>).

L'interaction Stomatine/Piezo-1 a été analysée suivant le même protocole mais à partir de membranes de GR (« stromas ») obtenues par lyse hypotonique et repérées à l'ImageStream grâce à un marquage préalable par la phalloïdine (antiacétine).

Au moins 5 000 événements sont analysés à l'ImageStream après sélection des GR et des stromas par application d'un masque morphologique, le critère de marquage à la phalloïdine étant en plus appliqué aux stromas.

**Résultats.** Dans le GR, quand la réaction est faite en présence des deux anticorps antipannexine et antistomatine, 13,7 % des événements sont PLA positifs, alors que pour les témoins négatifs correspondant à l'incubation avec l'antistomatine seul ou l'antipannexine seul, 2,0 % et 0,6 % respectivement sont PLA positifs.

Dans les stromas, quand la réaction est faite en présence des deux anticorps anti-Piezo-1 et antistomatine, 30,0 % des événements sont PLA positifs, alors que pour les témoins négatifs correspondant à l'incubation avec l'antistomatine seul ou l'anti-Piezo-1 seul, 1,1 % et 2,8 % respectivement sont PLA positifs.

**Conclusion.** Dans un contexte non pathologique, la stomatine interagit potentiellement avec la pannexine et Piezo-1. Des études fonctionnelles permettront de déterminer si ces interactions ont un impact sur l'activité de ces canaux afin de mieux comprendre la répercussion de l'absence de la stomatine dans un contexte pathologique.

#### 02-10 ADK, une cause inattendue d'anémie macrocytaire constitutionnelle non syndromique

L. Mansour-Hendili<sup>1</sup>, A.C. Boschat<sup>2</sup>, S. Sanquer<sup>2</sup>, C. Gameiro<sup>3</sup>, A. Aissat<sup>1</sup>, S. Moutereau<sup>4</sup>, C. Aubrun<sup>5</sup>, I. Rosa-Hezode<sup>6</sup>, B. Funaloï<sup>7</sup>, F. Galacteros<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Génétique, Hôpital Henri-Mondor (AP-HP), Créteil Cedex ; <sup>2</sup> Biochimie métabolomique et protéomique, Hôpital Necker AP-HP, Paris ; <sup>3</sup> Laboratoire de génétique, AP-HP, Créteil ; <sup>4</sup> Département de biochimie-toxicologie, IMRB-U955, Equipe 2 émergente : Transfusion et maladies du globule rouge, Institut Mondor, Créteil ; <sup>5</sup> UMGR, Hôpital Henri-Mondor AP-HP, Créteil ; <sup>6</sup> Hépatogastro-entérologie, CH Intercommunal de Créteil, Créteil ; <sup>7</sup> Génétique médicale, Hôpital Henri Mondor, Créteil ; <sup>8</sup> Centre de référence des syndromes drépanocytaires majeurs, hôpital Henri Mondor, AP-HP ; Upec, IMRB-U955, Equipe 2 émergente : Transfusion et maladies du globule rouge, Institut Mondor, Créteil

**Introduction.** ADK code l'adénosine kinase enzyme clé du métabolisme des bases puriques et de la méthionine qui transforme l'adénosine en AMP. Elle est présente dans de nombreux tissus dont le tissu hématopoïétique. Des mutations homozygotes du gène ADK sont décrites dans le syndrome d'hyperméthioninémie due à un déficit en adénosine kinase qui associe de manière constante un retard du développement neurologique important, une dysmorphie faciale et une hypotonie. D'autres signes comme l'ictère néonatal, l'atteinte hépatique, la petite taille ou l'anémie mégalo-blastique... arrivent en second plan.

**Matériels et méthodes.** L'ADN a été extrait du sang EDTA par technique Flexigene (Qiagen) et de bulbes capillaires sur automate Maxwell RSC (Promega). Le SHD (séquençage haut débit) utilise une capture exomique (Medexome, Roche) puis un séquençage sur Next-seq500 (Illumina). L'analyse bio-informatique a été réalisée via un pipeline BWA/GATK best practices et l'interprétation via le logiciel IVA (Ingenuity variant analyzer, Qiagen) basée sur une liste de gènes codant pour le protéome du globule rouge. L'étude métabolomique et protéomique faite à l'Hôpital Necker a été réalisée par spectrométrie de masse triple quadripôle Xevo TQ-S couplée à un système de chromatographie liquide ultra-haute pression Acquity H-Class (UPLC).

**Résultats.** Mme C., 62 ans présente depuis plus de 30 ans une anémie macrocytaire multi-explorée, avec surcharge en fer, non étiquetée et sans histoire familiale d'anémie. L'analyse par SHD type exome nous a permis d'identifier une variation de signification incertaine (probablement délétère) dans le gène ADK à l'état homozygote c.1012C>T (p. Arg338Cys) (gnomAD : MAF 0,0024 %, pas d'homozygotes ; CADD score 26,3). Elle a été confirmée par séquençage Sanger sur le sang et les bulbes capillaires. Cette variation est située dans la partie C-terminale de l'enzyme à proximité immédiate d'un des sites de fixation à l'ATP. La réanalyse du dossier clinique et l'interrogatoire *a posteriori* de la patiente ont permis de noter dans ses antécédents une stéatose hépatique non alcoolique, un diabète de type 2, une HTA, un syndrome sec, des lithiases urinaires, des difficultés d'apprentissage (arrêt précoce scolarité), une surdité neurosensorielle sans dysmorphie faciale ni microcéphalie. Des explorations fonctionnelles intra-érythrocytaires ont été réalisées dans le service de Biochimie spécialisée de l'Hôpital Necker et ont montré une augmentation d'adénosine chez la patiente associée à une diminution d'AMP et d'ADP. Ceci va dans le sens d'une perte de fonction de l'enzyme.

**Conclusion.** La diminution d'AMP et d'ATP dans les globules rouges de la patiente pourrait expliquer l'anémie macrocytaire observée. ADK ressort comme une nouvelle piste à explorer dans le monde des anémies macrocytaires constitutionnelles non étiquetées. Il semble fort probable que sa stéatose hépatique, son retard des acquisitions et sa surdité neurosensorielle puissent être liés à son déficit en ADK mais la présentation initiale était isolée. Ce cas serait la première description de mutations perte de fonction du gène ADK sans atteinte neurologique importante ni dysmorphie faciale.

#### 02-11 Une « association de malfaiteurs » dans le globule rouge dévoilée par le séquençage haut débit

L. Mansour-Hendili<sup>1</sup>, S. Tarfi<sup>2</sup>, B. Badaoui<sup>3</sup>, A. Aissat<sup>1</sup>, C. Gameiro<sup>4</sup>, S. Moutereau<sup>5</sup>, E. Faubert<sup>6</sup>, C. Makowski<sup>7</sup>, C. Barro<sup>8</sup>, F. Garban<sup>9</sup>, G. De Luna<sup>10</sup>, V. Picard<sup>11</sup>, F. Galacteros<sup>12</sup>, B. Funaloï<sup>13</sup>

<sup>1</sup> Département de génétique, Hôpital Henri-Mondor (AP-HP), Créteil Cedex ;  
<sup>2</sup> Service d'hématologie biologique, Hôpital Robert-Debré, Paris ;  
<sup>3</sup> Hématologie Cellulaire, Hôpital Henri-Mondor AP-HP, Créteil ;  
<sup>4</sup> Département de génétique, AP-HP, Créteil ; <sup>5</sup> Département de biochimie-toxicologie, IMRB-U955, Équipe 2 émergente : Transfusion et maladies du globule rouge, Institut Mondor, Créteil ; <sup>6</sup> Département de génétique, Hôpital Henri-Mondor AP-HP, Créteil ; <sup>7</sup> Hématologie, CHU Grenoble Alpes, La Tronche ; <sup>8</sup> Laboratoire d'hématologie, CHU Grenoble Alpes, La Tronche ; <sup>9</sup> Hématologie, CHU de Grenoble Alpes CS10217 38043 Grenoble cedex 9, Grenoble ; <sup>10</sup> UMGG, Hôpital Henri-Mondor AP-HP, Créteil ; <sup>11</sup> Hématologie biologique, Hôpital Bicêtre, GH Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre ; <sup>12</sup> Centre de référence des syndromes drépanocytaires majeurs, hôpital Henri Mondor, AP-HP ; Upec, IMRB-U955, Équipe 2 émergente : Transfusion et maladies du globule rouge, Institut Mondor, Créteil ; <sup>13</sup> Département de génétique, Hôpital Henri Mondor, Créteil

**Introduction.** L'association du trait S à l'ovalocytose du sud-est asiatique (OSEA) a déjà été décrite dans la littérature mais reste rare. Nous rapportons ici l'association inédite d'un trait S, d'une ovalocytose du Sud-Est asiatique, d'une elliptocytose et d'une stomatocytose héréditaire déshydratée (DHSt) dans une famille originaire des Comores et dont le diagnostic a pu être posé grâce au séquençage haut débit (SHD).

**Patients et méthodes.** L'ADN a été extrait sur sang total par technique Flexigene (Qiagen). Le cas index, P36, a été exploré en SHD et ses apparentés, P36-1 et P36-2 en séquençage Sanger ciblé. Le SHD a été réalisé avec les kits KAPA et le kit Medexome (Roche Nimblegen) sur Nextseq500 (Illumina). L'analyse bio-informatique utilise un pipeline maison BWA/GATK *best practices* et le logiciel Seqnext (JSL). L'interprétation se fait via IVA (Ingenuity variant analyzer, Qiagen) et le logiciel Alamut (Interactive Biosoftware). Des tests phénotypiques du Globule rouge (GR) ont également été réalisés : test EMA, éktactométrie, frottis, mesure d'activités des enzymes du GR, étude de l'hémoglobine, courbe de densité. . .

**Résultats.** P36 est une femme d'origine comorienne hétérozygote A/S ayant présenté un infarctus splénique lors d'un vol long-courrier. Elle est atteinte d'une anémie hémolytique normocytaire normochrome régénérative avec des anomalies morphologiques des GR discordantes avec le trait S. Le SHD a permis de montrer la coexistence chez cette patiente d'une OSEA, d'une stomatocytose héréditaire déshydratée (DHSt), d'une elliptocytose, d'un trait drépanocyttaire et d'un variant *G6PD* type Matera A- à l'état hétérozygote. Cette association de variations est inédite. Sa fille, P36-1, présente le même génotype excepté le variant *G6PD* absent chez elle. Elle a une anémie hémolytique normocytaire, normochrome régénérative asymptomatique. L'ektactométrie et le test EMA réalisés chez elle ont conclu à une OSEA. L'examen du frottis sanguin a montré des globules rouges ovalostomatocytaires atypiques. Un autre apparenté, P36-2, souffrant d'une anémie hémolytique normochrome normocytaire, d'une rétinopathie et splénectomisé dans l'enfance porte aussi toutes les variations familiales à l'état hétérozygote excepté le variant *G6PD*.

**Conclusion.** L'analyse génétique a permis de montrer l'association de différentes maladies génétiques du globule rouge chez les membres de cette famille. Cette association rend délicate l'interprétation des tests phénotypiques. Elle a fait manquer le diagnostic de DHSt dans l'enfance chez un membre de la famille, qui a été splénectomisé (alors que la DHSt contre-indique la splénectomie du fait de la survenue possible de complications thrombotiques majeures). Une telle association n'a jamais été identifiée et son effet précis sur la membrane du GR ne peut être prédit.

#### 02-12 Intérêt de l'utilisation combinée de paramètres du SYSMEX XN-10 comme stratégie de dépistage des pathologies constitutionnelles du globule rouge et de la carence martiale

V. Nivaggioni<sup>\*1</sup>, L. Bouriche<sup>1</sup>, AS. Le Floch<sup>1</sup>, C. Leonnet<sup>1</sup>, I. Arnoux<sup>1</sup>, M. Loosveld<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire hématologie, hôpital de La Timone, AP-HM, Marseille ; <sup>2</sup> LBM Vert-Coteau, Synlab Provence, Marseille

**Introduction.** Les pathologies constitutionnelles du globule rouge telles que les hémoglobinopathies et les anomalies de la membrane sont des affections héréditaires fréquentes en France entraînant une perturbation plus ou moins forte des paramètres érythrocytaires. À côté de ces pathologies constitutionnelles, de nombreuses situations acquises telle que l'anémie par carence martiale modifient également les résultats de l'hémogramme. Les anomalies d'un ou de plusieurs paramètres érythrocytaires et/ou réticulocytaires sont donc observées couramment dans un laboratoire de biologie médicale et leur management constitue un véritable challenge. Dans ce contexte, nous avons analysé les paramètres érythrocytaires et réticulocytaires de l'automate SYSMEX XN-10 afin de proposer un arbre décisionnel permettant d'isoler les patients atteints de pathologies constitutionnelles du globule rouge de ceux présentant une anémie par carence martiale, une anomalie acquise de la lignée érythrocytaire ou de patients « normaux ».

**Patients et méthodes.** Au cours d'une étude rétrospective et unicentrique, les résultats des différents paramètres érythrocytaires et réticulocytaires d'une cohorte composée de 8 217 adultes de plus de 15 ans ont été analysés. La population est divisée en cinq groupes : anémie par carence martiale (n = 120), hémoglobinopathie hétérozygote (n = 92), syndrome drépanocyttaire (n = 56), sphérocytose héréditaire (n = 18) et un groupe de patients ne présentant ni pathologie héréditaire du globule rouge ni anémie par carence martiale (n = 7 931). La méthodologie CART (*classification and regression tree*) a été utilisée pour obtenir un arbre décisionnel construit en deux étapes dans le but de prédire les cinq groupes précédemment cités.

**Résultats.** Six paramètres ont été sélectionnés par la méthode CART : la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, le pourcentage de microcytes, la largeur de la courbe de distribution de l'histogramme des hématies, le pourcentage d'érythroblastes, la fraction des réticulocytes les plus immatures et le RBC score. L'application de cet algorithme nous permet de correctement classer 158/166 patients porteurs d'une pathologie héréditaire du globule rouge (sensibilité = 95,2% et spécificité = 99,9%) ainsi que 114/120 patients atteints d'une anémie par carence martiale. Globalement, 99,4 % des patients testés sont correctement prédits.

**Conclusion.** Nous proposons un arbre décisionnel en deux étapes donnant une bonne prédiction et classification des pathologies héréditaires du globule rouge. Ces résultats pourraient être utilisés pour optimiser l'ajout de réticulocytes et comme critère d'étalement pour la revue microscopique du frottis sanguin.

#### 02-13 Étude *in vivo* via CRISPR/Cas9 de variants du facteur de réponse au choc thermique 1 dans l'érythropoïèse

H. Campario<sup>\*1</sup>, B. Pruvot<sup>2</sup>, L. Micalletto<sup>2</sup>, C. Garrido<sup>2</sup>, F. Girodon<sup>1</sup>, J. Chlubna<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hématologie Biologique, CHU Dijon, Dijon ; <sup>2</sup> Inserm U1231, Université de Bourgogne, Dijon

**Introduction.** La réponse au choc thermique est un mécanisme très bien conservé dans l'évolution permettant la protection des cellules de l'organisme en condition de stress. Le facteur de réponse au choc thermique (HSF1) est le facteur de transcription principal des gènes des protéines de choc thermique (HSP). Des études précédentes sur les HSP ont montré que la protéine HSP27 contrôlait GATA-1 durant la différenciation érythroïde et que la protéine HSP70 d'une part régulait l'érythropoïèse en protégeant GATA-1 du clivage par la caspase 3, et d'autre part entraînait une érythropoïèse inefficace dans les  $\beta$ -thalassémies par séquestration par les globines  $\alpha$  libres. Comme la transcription des gènes HSP est contrôlée principalement par HSF1, il est légitime de penser que le gène HSF1 pourrait jouer un rôle dans l'érythropoïèse.

**Matériels et méthodes.** Pour étudier l'effet d'Hsf1 sur l'érythropoïèse, nous avons invalidé le gène *hsf1* par la technique CRISPR/Cas9 chez le poisson zèbre. Des poissons zèbres de génération F2 KO pour *hsf1* (*hsf1*<sup>-/-</sup>) ont été croisés avec des poissons transgéniques Tg (globin : gfp). Les larves de ces poissons ont été analysées par RT-qPCR pour l'expression de gènes, par cytométrie en flux, imagerie et marquage des érythrocytes par coloration o-dianisidine.

**Résultats.** Dans un premier temps, nous avons montré dans nos lignées KO *hsf1*<sup>-/-</sup> une diminution de l'expression des gènes des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de globine par RT-qPCR associée à une diminution de l'hémoglobine dans les érythrocytes circulants par une coloration o-dianisidine. Ces résultats sont confirmés par une diminution du nombre d'érythrocytes lors de leur quantification par cytométrie en flux à partir de la lignée Tg (*hsf1*<sup>-/-</sup>/globine : gfp). Dans un deuxième temps, nous avons démontré que Hsf1 était nécessaire pour la maturation des érythrocytes primitifs qui est régulée par le facteur de transcription hématopoïétique Gata1. En effet, l'expression de *gata1* diminue lorsque *hsf1* est invalidé. La comparaison de la morphologie des érythrocytes entre les embryons *hsf1*<sup>-/-</sup> et les embryons contrôles a révélé une inhibition de la maturation des érythrocytes dans les embryons *hsf1*<sup>-/-</sup> avec un noyau granuleux et une chromatine moins condensée par rapport aux érythrocytes des embryons contrôles.

**Conclusion.** L'obtention d'un modèle knock-out pour le gène *hsf1* par la technique de CRISPR/CAS9 chez le poisson zèbre semble confirmer que le facteur de transcription Hsf1 est nécessaire pour la mise en place de l'érythropoïèse primitive chez le poisson zèbre. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour comprendre les détails de l'action de *hsf1* sur les mécanismes de régulation de l'hématopoïèse et plus précisément de l'érythropoïèse *in vivo*.

#### 02-14 Anémie et hémodilution : analyse d'une cohorte monocentrique de 2 858 masses sanguines

L. Drevon<sup>1</sup>, N. Maslah<sup>2</sup>, J. Soret-Dulphy<sup>3</sup>, C. Dosquet<sup>4</sup>, O. Ravdan<sup>2</sup>, L. Vercellino<sup>5</sup>, C. Belkhouja<sup>2</sup>, N. Parquet<sup>6</sup>, A. Brignier<sup>7</sup>, MH. Schlageter<sup>8</sup>, MH. Schlageter<sup>8</sup>, B. Cassinat<sup>9</sup>, JJ. Kiladjian<sup>10</sup>, C. Chomienne<sup>11</sup>, S. Giraudier<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup> Service de biologie cellulaire, AP-HP, Paris ; <sup>2</sup> Service de biologie cellulaire, Hôpital Saint-Louis (AP-HP), Paris ; <sup>3</sup> Centre d'investigations cliniques, Hôpital Saint-Louis (AP-HP), Paris ; <sup>4</sup> Hôpital saint louis, service de biologie cellulaire, Paris ; <sup>5</sup> Service de médecine nucléaire, hôpital saint louis, AP-HP, Paris ; <sup>6</sup> Service d'aphérese thérapeutique, Hôpital Saint-Louis (AP-HP), Paris ; <sup>7</sup> Service d'aphérese thérapeutique, Hôpital Saint-Louis AP-HP, Paris ; <sup>8</sup> Biologie cellulaire, Hôpital Saint-Louis (AP-HP), Paris ; <sup>9</sup> Hôpital saint-Louis, service de biologie cellulaire, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris ; <sup>10</sup> Centre d'investigations cliniques, hôpital Saint-Louis, Paris ; <sup>11</sup> Inserm U1131, Institut universitaire d'hématologie, Paris

**Introduction.** Les anémies sont les plus fréquentes pathologies hématologiques dans le monde. Dans les anémies sévères (< 8 g/dL) le recours aux transfusions est souvent requis. Environ 85 millions d'unités de globules rouges sont transfusées chaque année. Dans une étude récente, Otto *et al.* (2017) ont montré qu'environ la moitié des diminutions des taux d'hémoglobine étaient en fait liées à des hémodilutions et non à des anémies, laissant suggérer que la moitié des transfusions réalisées n'étaient pas justifiées. Nous avons voulu déterminer si, dans notre centre, les patients « anémiques » présentaient en fait une hémodilution plus qu'une anémie.

**Patients et méthodes.** Nous avons analysé les résultats de masses sanguines (RCM) (globules rouges marqués au Cr51) et de volumes plasmatiques (PV) (Albumine marquée à 1125), chez 2 858 patients vus entre 2010 et 2017. Nous avons sélectionné les patients présentant une diminution de l'Hémoglobine (n = 63) (< 12 et 13 g/dL respectivement pour les femmes et les hommes), un groupe contrôle non anémique et un groupe de patients polyglobuliques [Hb] (> 16 g/dL-16,5 g/dL) (n = 1 815).

**Résultats.** Les patients anémiques présentent une augmentation du PV (PV +41 % vs. -5 % chez les sujets contrôles, p < 0,0001) 94 % d'entre eux ont un PV > +8 % (vs. 9 % dans le groupe contrôle) et 73 % un PV > +25 % (vs. 0 %), confirmant les données de Otto *et al.*

Le RCM est également différent (RCM moyen -12,7 % chez les sujets « anémiques » vs +8,8 %, p < 0,0001). En pratique, seuls 24 % des sujets dits « anémiques » ont une réduction du RCM. En fait, même parmi les patients présentant une anémie sévère (*i.e.* Hb < 8 g/dL), 77,8 % des patients présentent une hémodilution importante (PV > +25 %) expliquant au moins en partie la baisse du taux d'hémoglobine.

Nous avons également analysé l'effet de la présence d'une splénomégalie puisque la splénomégalie est considérée comme une cause importante d'augmentation du volume plasmatique. La splénomégalie était notée chez 46 % des patients anémiques. Ces patients présentent une augmentation du PV plus importante que les sujets anémiques sans splénomégalie (+49 % vs. +34 %, p = 0,03). Cependant, les patients anémiques sans splénomégalie ont également une augmentation du PV comparé aux sujets sains (+34 % vs. -5 %, p < 0,0001).

Nous avons secondairement analysé les concentrations sériques d'EPO chez les sujets présentant une baisse de l'hémoglobine. Seuls les patients présentant une « anémie vraie » (*i.e.* diminution du volume globulaire) présentent une augmentation de la concentration en EPO. Cependant, l'overlap avec les concentrations chez les sujets sains est important.

**Conclusion.** Nous confirmons les données d'Otto *et al.* quant à la forte proportion de patients présentant une hémodilution chez les sujets anémiques, cependant, chez les patients présentant une anémie sévère (*i.e.* Hb < 8 g/dL) la baisse de la masse sanguine est bien retrouvée chez 90 % des patients, justifiant les interventions thérapeutiques visant à corriger l'anémie.

Par contre, chez les sujets présentant des anémies modérées la moitié des patients présentent en fait une hémodilution sans réduction du volume globulaire. Les interventions thérapeutiques visant à augmenter la production d'EPO doivent donc être rediscutées après avoir éliminé une hémodilution comme cause de la baisse de la concentration en Hb.

## 02-15 Ferritine élevée et démarches diagnostiques en pratique hématologique de routine

S. Misra\*<sup>1</sup>, G. Dine<sup>2</sup>, G. Daniela<sup>3</sup>, A. Santagostino<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Hématologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris ; <sup>2</sup> Biotechnology, Institute Biotechnology de Troyes, Troyes ; <sup>3</sup> Hématologie, CH de Troyes, Troyes ; <sup>4</sup> Hématologie, CH de Troyes, Troyes

**Introduction.** L'hyperferritinémie est l'une des principales causes de consultation en hématologie. Le faible niveau de ferritine indique toujours une carence en fer mais une hyperferritinémie représente diverses situations cliniques telles qu'une surcharge en fer, une inflammation, un syndrome de libération de cytokines ou même une condition dysmétabolique. Un taux de ferritine très élevé est observé dans les situations d'urgence telles que la lymphohistiocytose hémophagocytaire (HLH), l'hépatite fulminante, la réactivation immunitaire Syndrome d'inflammation (IRIS) et syndrome de libération de cytokines (CRS), etc. Un taux de ferritine modérément élevé est rencontré dans des situations non urgentes

telles que dans des conditions de surcharge en fer primaire et secondaire et aussi d'autres affections non liées à une surcharge telles que la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD), l'hémolyse chronique, l'éthylisme, l'obésité, l'altération de la tolérance glycémique. Dans notre expérience monocentrique d'hématologie adulte, le NAFLD est la principale cause d'hyperferritinémie. La mesure de l'élasticité du foie par Fibroscan permet un diagnostic précoce de la cirrhose hépatique.

**Matériels et méthodes.** Une étude observationnelle a été menée auprès des patients fréquentant la consultation d'hématologie pour l'hyperferritinémie. L'enquête initiale comporte des études sur le fer, les paramètres inflammatoires, le statut HFE, l'hémoglobine glyquée, le profil lipidique, l'uricémie, les paramètres viraux et l'échographie hépatique. Les patients HFE négatifs et hétérozygotes sont soumis à des études de Fibroscan et d'IRM du foie.

**Résultats.** Le NAFLD est la principale cause d'hyperferritinémie suivi par hémochromatose HFE. La ferritine sérique est un prédicteur de la gravité histologique et de la fibrose avancée chez les patients atteints de NAFLD. Les autres causes moins fréquentes provoquant l'hyperferritinémie sont entre autres une résistance à l'insuline survenant dans le diabète de type 2 sans surcharge en fer évidente. Les autres conditions d'hyperferritinémie associées à l'anémie sont les conditions inflammatoires chroniques, les anémies sidéroblastiques, le syndrome myélodysplasique et l'hémolyse chronique liée aux hémoglobinopathies et sphérocytose héréditaire. L'hémolyse chronique sans anémie constitue aussi une rare étiologie de l'hyperferritinémie. L'hyperferritinémie a été la seule présentation chez quelques patients atteints de cirrhose et d'hépatite alcoolique. Deux patients avec hémochromatose non HFE ont évolué vers myélodysplasie.

**Discussion.** La phlébotomie est le traitement de choix dans l'hémochromatose héréditaire et d'autres conditions de surcharge ferrique non anémique. L'IRM hépatique est cruciale dans l'hémochromatose non HFE. La phlébotomie ne joue aucun rôle dans la NAFLD. Le rôle positif de la phlébotomie dans la résistance à l'insuline reste un débat. Pour expliquer le développement de la myélodysplasie chez nos patients, le rôle causal du stress oxydatif doit être étudié. Bien que les marqueurs du fer et de l'érythropoïèse soient bien explorés, il n'y a pas d'études récentes sur le transfert de fer des macrophages dans une île érythroblastique. En l'absence d'hémochromatose héréditaire, l'attention est focalisée sur un diagnostic possible de NAFLD. Nous avons développé un algorithme pour les patients adultes présentant une hyperferritinémie.

**Conclusion.** Une approche intégrée d'hépatologue et d'hématologue est obligatoire.

## 02-16 Évaluation de l'intérêt de l'équivalent réticulocytaire en hémoglobine dans la détection de la carence martiale latente

G. Bouzid\*<sup>1</sup>, N. Yousfi<sup>1</sup>, Z. Ben Hassine<sup>1</sup>, S. Ben. Rjab<sup>1</sup>, S. Bezzaouia<sup>1</sup>, S. Mami<sup>1</sup>, S. Omar<sup>2</sup>, N. Ben Salah<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire, Hôpital régional de Ben Arous, Ben Arous, Tunisie ;

<sup>2</sup> Laboratoire, Institut national de neurologie Mongi Ben Hamida, Tunis, Tunisie

**Introduction.** L'équivalent réticulocytaire en hémoglobine (RET-He) reflète la teneur en hémoglobine (Hb) des réticulocytes. Récemment disponible avec les nouveaux compteurs de cellules, mais non utilisé de routine en biologie clinique.

Le RET-He est un marqueur accessible et peu influencé par l'inflammation. Il reflète directement le contenu du fer intra-érythrocytaire et permet ainsi une estimation directe du fer fonctionnel disponible pour l'érythropoïèse.

L'objectif de notre travail est d'étudier l'intérêt du RET-He dans la détection des carences martiales latentes (CML).

**Patients et méthodes.** Il s'agit d'une étude transversale incluant 100 volontaires sains. Afin de dépister les carences martiales latentes nous avons réalisé un hémogramme avec un dosage de la ferritinémie. L'interrogatoire a permis d'exclure les syndromes inflammatoires. L'hémogramme a été réalisé sur automate Sysmex<sup>®</sup> XN 4 000. Le dosage de la ferritinémie a été fait par technique *enzyme linked fluorescent assay* (ELFA) sur le MINI-VIDAS<sup>®</sup>. Nous avons exclu les anémies normochromes normocytaires, les pseudo-polyglobulies microcytaires et les syndromes inflammatoires biologiques.

Les patients avec un taux d'Hb normal (F : Hb ≥ 12 g/dL ; H : ≥ 13 g/dL) ont été divisés en deux groupes : Un groupe témoin (groupe 1) avec une ferritinémie > 15 ng/mL et un groupe présentant une CML (groupe 2) avec une ferritinémie < 15 ng/mL. Nous avons comparé tous les paramètres de l'hémogramme des deux groupes.

L'analyse statistique a été faite au moyen du logiciel IBM SPSS Statistics version 25.

**Résultats.** Parmi les 100 volontaires sains 65 avaient une Hb normale (65 %). Le groupe 1 comporte 48 témoins, et le groupe 2 17 cas de CML. En analyse univariée, nous avons retrouvé une différence statistiquement significative entre les deux groupes pour les paramètres suivants : hémoglobine, CCMH, RET-He. La moyenne de l'hémoglobine dans le groupe 1 est de 13,6 g/dL (12-17,6 g/dL), elle est de 12,8 g/dL dans le groupe 2 (12,1-13,4 g/dL) (p = 0,02). La moyenne CCMH

dans le groupe 1 est de 34,9 (31,8 à 36,7), dans le groupe 2 elle est de 34,3 (32,8 à 36,5) ( $p = 0,03$ ). La moyenne de RET-He dans le groupe 1 est de 31,2 pg (27,7 pg à 34 pg), dans le groupe 2 elle est de 29,6 pg (26,5 pg à 30,8 pg) ( $p < 0,001$ ).

En analyse multivariée, seule le RET-He garde une différence statistiquement significative entre les deux groupes ( $p < 0,001$ ). Nous avons étudié la valeur diagnostique du RET-He pour la détection d'une CML par la courbe ROC (aire sous la courbe = 0,826): *cut-off* du RET = 30,8 pg avec une sensibilité  $Se = 66,7\%$  et une spécificité  $Sp = 100\%$ .

**Conclusion.** Le RET-He est un paramètre intéressant à évaluer pour détecter les CML fréquentes dans notre contexte socio-économique. Il est peu coûteux et permet d'entamer une prise en charge thérapeutique adéquate afin d'éviter une carence martiale.

### 02-17 Intérêt des indices érythrocytaires et réticulocytaires dans le diagnostic des stomatocytoses héréditaires

V. Picard<sup>1</sup>, C. Guittou<sup>2</sup>, L. Mansour-Hendili<sup>3</sup>, B. Jondeau<sup>4</sup>, M. Denguir<sup>5</sup>, J. Demagny<sup>6</sup>, V. Proulle<sup>7</sup>, F. Galacteros<sup>8</sup>, L. Garçon<sup>9</sup>

<sup>1</sup> Hématologie biologique, Hôpital Bicêtre, GH Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre et Faculté de pharmacie, Univ Paris Saclay ; <sup>2</sup> Service de pédiatrie générale, filière McGre, Hôpital Bicêtre, GHU Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre ; <sup>3</sup> génétique, Hôpital Henri-Mondor (AP-HP), Créteil Cedex ; <sup>4</sup> Hématologie biologique, Hôpital Bicêtre, AP-HP, GH Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre ; <sup>5</sup> Biochimie, Hôpital Bicêtre, AP-HP, GH Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre ; <sup>6</sup> Ea4666 Hematim, Université de Picardie Jules Verne, Amiens ; <sup>7</sup> Service Hématologie Biologique, CHU Bicêtre, HUPS, AP-HP, Université Paris Sud Paris Saclay, Inserm UMR\_1176, Le Kremlin-Bicêtre ; <sup>8</sup> Centre de référence des syndromes drépanocytaires majeurs, hôpital Henri Mondor, AP-HP ; Upec, IMRB-U955, Équipe 2 émergente : Transfusion et maladies du globule rouge, Institut Mondor, Créteil ; <sup>9</sup> Laboratoire d'hématologie, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, et EA4666, UPJV, CHU Amiens

**Introduction.** La stomatocytose héréditaire de type 2 ou canalopathie « Gardos » (DHS Gardos) est une anémie hémolytique constitutionnelle due à des mutations gain de fonction du gène *KCNN4*, elle est plus rare que la stomatocytose liée au gène *PIEZO1* (DHS Piezo1) et son diagnostic est difficile étant donné l'absence de phénotype clinique et biologique spécifique. Il repose sur l'analyse génétique, souvent réalisée après de nombreuses autres investigations.

**Patients et méthodes.** Dans cette étude rétrospective, nous avons étudié 16 patients, issus de neuf familles dont six décrites, présentant une canalopathie Gardos. Les indices érythrocytaires ont été mesurés sur un analyseur de type ADVIA 2120 (Siemens<sup>®</sup>), qui détermine aussi les constantes réticulocytaires, en particulier le VGM et la CCMH des réticulocytes (VGMr et CCMHr). Ces paramètres ont été comparés à ceux de 91 patients déjà décrits présentant une DHS Piezo1.

**Résultats.** Parmi les 16 sujets présentant une canalopathie Gardos, douze cas (sept familles) présentaient la mutation récurrente p.Arg352His, quatre cas (deux familles) présentaient une mutation privée du gène *KCNN4*. Comme il a déjà été observé, le taux moyen d'hémoglobine était inférieur dans la DHS Gardos vs Piezo1 ( $104 \pm 14$  vs  $134 \pm 19$  g/L,  $p < 0,05$ ), le VGM n'était pas significativement différent ( $98,3 \pm 8$  vs  $97,7 \pm 8$  fl) et la CCMH était plus basse chez les sujets Gardos-mutés que chez les sujets Piezo1-mutés ( $333 \pm 11$  vs  $354 \pm 24$  g/L,  $p < 0,01$ ), ce qui confirme la déshydratation des globules rouges (GR) dans la DHS Piezo1 et non dans la DHS Gardos. En analysant les constantes réticulocytaires, nous avons observé que, paradoxalement, dans la DHS Gardos, la taille moyenne des réticulocytes était inférieure à celle des GR ( $95,1 \pm 3$  vs  $97,7 \pm 8$  fl) et que leur CCMH était supérieure ( $367 \pm 16$  vs  $333 \pm 11$  g/L). Au contraire, dans la DHS Piezo1, comme attendu, les réticulocytes ont un VGM supérieur et une CCMH inférieure aux GR ( $113,7 \pm 7$  vs  $97,7 \pm 8$  fl et  $329 \pm 20$  vs  $354 \pm 24$  g/L respectivement). Nous avons donc comparé la différence VGMr-VGM ( $\Delta$ VGM) et CCMHr-CCMH ( $\Delta$ CCMH) chez les sujets Gardos-mutés et Piezo1-mutés, le  $\Delta$ VGM était :  $-0,9 \pm 5$  vs  $19,8 \pm 3$  fl ( $p < 0,001$ ) et le  $\Delta$ CCMH :  $18,7 \pm 13$  vs  $-50 \pm 8,7$  g/L ( $p < 0,001$ ).

**Discussion.** Dans cette série, l'une des plus importantes rapportée actuellement, la mesure des paramètres  $\Delta$ VGM et  $\Delta$ CCMH était hautement discriminante et a permis d'orienter très rapidement le diagnostic en faveur d'une canalopathie Gardos, en ciblant ces patients pour l'étude du gène *KCNN4* dès la réalisation de l'hémogramme. De façon notable, ces observations se sont révélées exactes pour chacun des sujets testés, quels que soient l'âge, la présence ou non d'une splénectomie ou la mutation concernée. Par ailleurs, cette particularité des réticulocytes dans la canalopathie Gardos n'a été observée dans aucune autre anémie hémolytique, d'origine constitutionnelle ou acquise.

**Conclusion.** Au total, ces résultats révèlent une nouvelle caractéristique spécifique des indices réticulocytaires dans la canalopathie Gardos, qui la distingue en particulier, de la DHS Piezo1. Si la cause de cette « anomalie » n'est pas définie et mérite plus d'investigations afin de caractériser ces réticulocytes, elle permet d'orienter très rapidement et sans

aucun coût supplémentaire, vers une étude génétique incluant le gène *KCNN4* et ainsi, de poser rapidement le diagnostic difficile de canalopathie Gardos.

### 02-18 Étude du vieillissement des globules rouges au cours de la conversation PSL grâce à l'orientation acoustique du cytomètre Attune NxT

R. Chafa<sup>1</sup>, Z. Raouf<sup>2</sup>, R. K.<sup>3</sup>, B. M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Hémobiologie et banque de sang, Hôpital Nedir Mohamed, Tizi Ouzou, Algérie ; <sup>2</sup> Laboratoire central, Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine, Constantine, Algérie ; <sup>3</sup> Laboratoire central, Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine, Constantine, Algérie ; <sup>4</sup> Hématologie, CHU ORAN, Oran, Algérie

**Introduction.** La diffusion de la lumière obtenue au moment du passage d'une cellule devant un fuseau laser d'un cytomètre de flux, dépend de son orientation spatiale. Les globules rouges génèrent la variation la plus importante sur la diffusion de la lumière laser en FAC et SC, en rapport avec leur structure exceptionnelle en disque biconcave. La focalisation hydrodynamique assistée par un système acoustique, améliore l'alignement des cellules dans le flux du liquide et stabilise leur orientation devant le laser. Les cytomètres acoustiques donnent un profil FAC/SC des GR très exceptionnel en forme d'un arc, avec deux degrés différents de diffusion de la lumière en FAC et deux autres degrés en SC. En cas d'une altération des globules rouges ou la perte de leur forme discoïde biconcave on remarque la disparition de ce profil très spécial en cytométrie de flux acoustique, ces anomalies érythrocytaires sont dues à une anomalie membranaire, fragilité osmotique, agression mécanique ou bien au vieillissement.

**Matériels et méthodes.** Le profil FAC/SC des globules rouges de 50 poches de sang conservées au niveau de la banque du sang, a été obtenu par un cytomètre acoustique Attune NxT. En absence de la solution saline de Hanks (HBSS), nous avons utilisé un plasma humain du groupe AB comme solution de dilution pour les CGR de groupe O. Le profil FAC/SC a été contrôlé à des différents temps de conservation et après péremption des CGR.

**Résultats.** Les CGR conservent leur profil FAC/SC pendant les premiers jours de conservation, ce dernier commence à disparaître au long de la conservation. La disparition totale du profil typique en arc a été enregistrée à partir du 30e jour de conservation.

**Conclusion.** La disparition du profil en arc des globules rouges est le témoin de leur vieillissement et la perte de la forme discoïde biconcave. La vérification du profil FAC/SC sur un cytomètre acoustique est une technique très facile à réaliser, très rapide où le temps nécessaire pour la préparation de l'échantillon et l'obtention du profil ne dépasse pas 1 à 2 mins, elle n'est pas coûteuse, attendu qu'on ne consomme aucun réactif. La transfusion des globules rouges en bonne santé est très indispensable pour l'amélioration du rendement transfusionnel dans certaines situations pathologiques, comme les patients polytransfusés atteints d'une hémoglobinopathie.

### 02-19 Altération de la déformabilité et de la circulation des globules rouges dans le contexte de la résistance aux traitements du paludisme

M. Depond<sup>1</sup>, C. Amaratunga<sup>2</sup>, C. Chambion<sup>1</sup>, L. Angella<sup>1</sup>, S. Sreng<sup>3</sup>, M. Ouj<sup>4</sup>, L. Paloque<sup>4</sup>, FM. Aurélie<sup>1</sup>, S. Mao<sup>5</sup>, C. Sopha<sup>6</sup>, B. Sam<sup>7</sup>, K. Stepniewska<sup>8</sup>, S. Suon<sup>3</sup>, S. Biligui<sup>9</sup>, P. Guerin<sup>8</sup>, JM. Augereau<sup>4</sup>, F. Benoît-Vical<sup>4</sup>, R. Fairhurst<sup>2</sup>, P. Buffet<sup>1</sup>, PA. Ndour<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ints, Inserm U1134, Paris ; <sup>2</sup> Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Rockville, États-Unis ; <sup>3</sup> Entomology and Malaria Control, National Center for Parasitology, Phnom Penh, Cambodge ; <sup>4</sup> Laboratoire de chimie de coordination - UPR8241, CNRS, Toulouse ; <sup>5</sup> Hospital, Sampov Meas Referral Hospital, Pouthisat, Cambodge ; <sup>6</sup> Hospital, Makara 16 Referral Hospital, Preah Vihear, Cambodge ; <sup>7</sup> Hospital, Ratanakiri Referral Hospital, Banlung, Cambodge ; <sup>8</sup> Infectious diseases data observatory (Iddo), WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN), Bangkok, Thaïlande ; <sup>9</sup> Cimi-Paris U1135, Hôpital Pitié Salpêtrière Pavillon Lavéran, Paris

**Introduction.** Les globules rouges (GR) sont la cible de l'infection du paludisme à *Plasmodium falciparum* (Pf) qui est l'infection parasitaire la plus fréquente à l'échelle mondiale. Les dérivés de l'artémisinine (ART) ont permis d'améliorer la survie des patients et représentent aujourd'hui la première ligne de traitement contre le paludisme. Les progrès obtenus par l'utilisation des ART sont menacés par l'émergence de résistance du parasite, caractérisée par une clairance retardée des GR infectés (GRI) et une recrudescence de l'infection. Il est indispensable de mieux comprendre les mécanismes de clairance érythrocytaire et parasitaire dans le contexte de cette résistance pour anticiper la prise en charge des patients infectés

par une souche résistante. Notre hypothèse repose sur la capacité phénotypique d'échappement à la rétention due à une déformabilité augmentée des GR infectés par des souches artémisinines-résistantes par rapport aux souches sensibles. La clairance des parasites est en partie due à la rétention splénique qui retient les GR infectés.

**Matériels et méthodes.** La clairance des GRi et le *pitting* (globule rouge circulant débarrassé de son parasite par la filtration splénique) ont été évalués sur 88 patients de trois sites géographiques du Cambodge, connus pour la présence ou non de souches résistantes aux ART. Les patients sont distingués selon un seuil de 5 h de demi-vie de clairance parasitaire. *In vitro*, une souche sensible aux ART, F32-TEM, sous pression de sélection a permis d'établir une souche résistante aux ART. Les deux souches (F32-TEM/F32-ART) traités par ART ont été marquées puis perfusés simultanément *ex vivo* dans des rates humaines isolées pour évaluer leur cinétique de clairance et de *pitting* évaluées par FACS (n = 4). L'utilisation de la streptolysine-O permet d'enrichir (> 90 %) un échantillon en GR infectés en lysant les GR non infectés. Des mesures de déformabilité des deux souches ont été réalisées par ektacytométrie après enrichissement par streptolysine-O.

**Résultats.** Les cinétiques de clairance des GRi des patients cambodgiens par Pf ont montré que les patients ayant une demi-vie de clairance supérieure à 5 h présentent également un retard d'apparition des GR pitéés. Le temps de demi-vie de clairance montre une forte corrélation avec le délai de *pitting* ( $p = 1,3 \times 10^{12}$ ). La perfusion de rates humaines *ex vivo* avec les deux souches a montré que 50 % des GRi par la souche sensible aux ART disparaissent de la circulation en moins de 4 minutes alors que pour la souche résistante aux ART il faut plus de 6 min. Par ailleurs, un plateau de maximum de clairance est atteint après 30 min où 5 % des GRi F32 TEM restent en circulation contre 20 % des GRi F32 ART (n = 4). Sur des perfusions de rates *ex vivo* longues (> 180 min, n = 2) la souche sensible montre un taux de *pitting* supérieure à la souche résistante (37 % vs 28 %). Des résultats préliminaires montrent que la mesure de déformabilité des GR infectés et enrichis par streptolysine-O a montré que les GR de la souche résistante aux ART sont plus déformables que ceux de la souche sensible lorsqu'ils sont exposés aux traitements.

**Conclusion.** Les délais de clairance et de *pitting* observés dans les cas de résistance aux ART chez les patients et dans le modèle de filtration splénique *ex vivo* suggèrent que les GR infectés par des parasites résistants aux ART échappent à la rétention splénique. La déformabilité accrue de la souche résistante pourrait expliquer la moindre rétention splénique et la clairance retardée des GR infectés par des souches de Pf résistantes aux ART.

## 02-20 Analyse de la gestion des gestes chirurgicaux chez le patient drépanocytaire

N. Zidani<sup>1</sup>, I. Boumaida<sup>1</sup>, N. Boudjerra<sup>2</sup>, Z. Kaci<sup>2</sup>

<sup>1</sup> hématologie, CHU Isaac Hassani de Beni Messous, Béni Messous, Algérie ; <sup>2</sup> Service d'hématologie, CHU Beni Messous, Alger, Algérie

**Introduction.** Au cours de la chirurgie la drépanocytose se caractérise par une morbidité et une mortalité élevées. En pré opératoire, la préparation vise à ramener la concentration de l'Hb S autour de 30-40 %. En péri opératoire, les modalités anesthésiques sont peu spécifiques, cependant certains impératifs doivent être respectés afin de minimiser le risque de falciformation. Dans le postopératoire, les complications ne sont pas rares, il s'agit des crises vaso-occlusives (CVO), du syndrome thoracique aigu (STA), de l'anémie et des thromboses. La prise en charge de ces complications passe par une bonne oxygénation, une hydratation adéquate parfois la transfusion, les antalgiques et les antithrombotiques.

**But.** Analyser la prise en charge des drépanocytaires et les différentes complications en pré, per et postopératoire dans les différents types de chirurgie.

**Patients et méthodes.** Nous avons étudié les différents gestes chirurgicaux chez les drépanocytaires homozygotes suivis au service d'hématologie. Une fiche a été établie pour le recueil des données à partir des dossiers médicaux des malades.

**Résultats.** Quatre-vingt-dix patients (pts) drépanocytaires homozygotes sont suivis à l'HDJ d'hématologie. Cinquante-sept (57 %) ont subi une chirurgie. L'âge médian était de 23 ans (3-40), le sex-ratio de 0,5 Cinquante et un gestes chirurgicaux ont été réalisés. Une cholécystectomie chez 24 pts (47,1 %), une césarienne chez 10 pts (19,6 %), une splénectomie chez cinq pts (9,8 %), prothèse totale de hanche chez quatre pts et de l'épaule chez un pts, une amygdalotomie chez deux pts (3,9 %), une appendicectomie chez un pts (2 %), tumorectomie un pts (2 %), une embolisation d'anévrysme un pts (2 %), ectopie testiculaire un pt (2 %) et une biopsie ganglionnaire un pt (2 %). En pré opératoire 40 pts (78,4 %) ont reçu un programme transfusionnel (10 TS et 30 ET). Onze pts (21,6 %) avaient une HbS > 40 %, 23 pts (45,1 %), entre 30-40 % et 17 pts (33,3 %) < 30 %. Le taux d'Hb moyen était de 9,21 g/dL (8-11). Deux pts avaient une sérologie de l'hépatite B positive. Tous les patients ont reçu une hyperhydratation, 48 pts (94,1 %) une oxygénothérapie, 49 pts (96,1 %) une sédation, 49 pts (96,1 %) une antibiothérapie prophylactique,

40 pts (78,5 %) anticoagulant. En postopératoire, On note la survenue d'un syndrome infectieux chez cinq pts (9,8 %) dont une angine, deux pneumopathies, deux infections. Les CVO chez neuf pts (17,6 %), STA chez trois pts (5,9 %), hémolyse aiguë chez cinq pts (9,8 %). Le taux moyen de plaquettes était de 387 972 (106 600-870 000). Aucun accident thrombotique n'a été noté. L'évolution était favorable pour tous les patients.

**Discussion.** La préparation pré et per opératoire rejoint dans la majorité des cas dans notre série les données de la littérature, ce qui a induit par conséquence une diminution des complications dans le postopératoire.

**Conclusion.** La chirurgie chez le drépanocytaire nécessite des mesures spécifiques préventives en pré, per et postopératoire afin d'éviter des complications graves.

## 02-21 Un cas de pyknocytose infantile avec de très nombreux corps de Heinz

V. Bobee<sup>1</sup>, V. Picard<sup>2</sup>, S. Moutereau<sup>3</sup>, S. Pissard<sup>4</sup>, B. Badaoui<sup>5</sup>, L. Mansour-Hendili<sup>6</sup>, S. Daliphard<sup>1</sup>, A. Lahary<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hématologie biologique, CHU Rouen, Rouen ; <sup>2</sup> Hématologie biologique, Hôpital Bicêtre, GH Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre ; <sup>3</sup> Laboratoire de biochimie, hôpital Henri-Mondor (AP-HP), 94 000, Créteil ; <sup>4</sup> Dep de génétique, GHU Henri-Mondor, Créteil ; <sup>5</sup> Hématologie cellulaire, hôpital Henri-Mondor AP-HP, Créteil ; <sup>6</sup> Génétique, hôpital Henri-Mondor (AP-HP), Créteil Cedex

**Introduction.** Un nouveau-né présente un ictère néonatal intense. À huit jours de vie, l'hémogramme montre une Hb à 10,9 g/dL et un VGM à 102 fL. Des réticulocytes sont prescrits, et une alarme *abnormal reticulocyte scattergram* (Sysmex XN) conduit à la préparation d'un frottis coloré au bleu de crésyl. Des inclusions bleuées périphériques correspondant à des Corps de Heinz sont observées de façon omniprésente dans les hématies et les réticulocytes sont estimés à 87 G/L. En parallèle est observée une anisopoikilocytose et d'assez nombreuses inclusions intra-érythrocytaires incluant des corps de Pappenheimer.

**Résultats.** Les corps de Heinz en grand nombre évoquent un stress oxydatif possiblement en rapport avec un déficit en G6PD. Trois jours plus tard, l'hémoglobine chute à 6,3 g/dL et les réticulocytes sont évalués à 176 G/L. Le test direct à l'antiglobuline est négatif. Les activités G6PD et PK se révèlent normales, tout comme l'étude de l'hémoglobine et le test à l'EMA. L'étude exhaustive des deux parents est normale. Une hémoglobine instable ou une enzymopathie rare sont alors évoquées : l'étude des gènes  $\alpha$  et  $\beta$ -globine ainsi que le panel étendu d'enzymes érythrocytaires sont normaux (Henri-Mondor).

Trois transfusions vont être nécessaires devant la déglobulisation persistante. Après RCP Globules Rouges, il est conseillé de réaliser un panel NGS Anémie Hémolytiques Chroniques ainsi qu'une ektacytométrie. L'ektacytométrie (Kremlin-Bicêtre) est normale mais l'analyse spécialisée de la morphologie érythrocytaire révèle la présence de pyknocytes. L'ensemble permet d'écarter une pathologie constitutionnelle de la membrane et est en faveur d'une pyknocytose infantile. A quatre mois, l'évolution clinicobiologique devient favorable avec normalisation de l'hémogramme et disparition des anomalies morphologiques. Le diagnostic est confirmé rétrospectivement.

**Discussion.** La pyknocytose infantile est une cause fréquente et sous-estimée d'anémie hémolytique du nouveau-né. Dans les formes typiques, le diagnostic est évoqué après observation attentive du frottis sanguin montrant la présence de pyknocytes, cellules hyperdenses à contours irréguliers et projections courtes. Il s'agit d'un diagnostic d'élimination qui nécessite notamment d'exclure enzymopathie, membranopathie et incompatibilité ABO. La confirmation est le plus souvent rétrospective avec une normalisation de l'hémogramme à 4-6 mois. Une à deux transfusions de CGR sont souvent nécessaires.

**Conclusion.** Il s'agit d'un cas de pyknocytose infantile particulièrement sévère, chez qui la présence de très nombreux corps de Heinz sur les frottis initiaux a été un élément confondant. Leur présence a déjà été rapportée et ne doit pas faire écarter le diagnostic. La physiopathologie de la pyknocytose est mal connue : des travaux en faveur d'un déficit en vitamine E induisant une peroxydation des lipides membranaires ont été publiés, et la présence d'un déficit transitoire en glutathion peroxydase érythrocytaire a été rapportée. Ces éléments associés à la présence des corps de Heinz témoignent d'un stress oxydatif particulier en période néonatale. Chez notre patient, il est à noter que les résultats du panel NGS (H. Mondor) ont par la suite retrouvé deux variants de signification indéterminée sur le gène de la spectrine  $\beta$  à l'état hétérozygote. Une étude de l'ARN est en cours afin d'évaluer l'impact de ces mutations et le possible lien avec la survenue de la pyknocytose.

## 02-22 Anémie chez les cirrhotiques : prévalence et étiologies

I. Akkari\*, S. Bradai, S. Mrabet, B.J. Elhem

Gastro-entérologie, CHU Farhat Hached, Sousse, Tunisie

**Introduction.** La survenue d'une anémie au cours de la cirrhose est fréquente. Sa prévalence varie de 40 à 70 % selon la littérature. Le but de ce travail était de déterminer la prévalence de l'anémie et d'identifier ses différents types chez les patients suivis pour cirrhose.

**Patients et méthodes.** Il s'agit d'une étude colligeant tous les patients cirrhotiques sur une période de quatre ans au service de gastro-entérologie de l'hôpital Farhat Hached Sousse.

**Résultats.** Au total, 71 patients d'âge moyen de 62 ans [25,83] ont été colligés. L'origine virale de la cirrhose était la cause la plus fréquente (40,8 %). La sévérité de la cirrhose selon le score Child-Pugh était répartie comme suit : Child A dans 32,5 %, Child B dans 38 % et Child C dans 29,5 % des cas.

La prévalence de l'anémie était de 77,5 % (n = 55). Le taux moyen d'hémoglobine était 9,9 g/dL (extrême : 13,4 et 4,4 g/dL). L'anémie était jugée sévère avec un taux d'hémoglobine < 8 g/dL dans 12,6 % des cas (n = 9).

L'anémie était normocytaire chez 56,3 % des patients anémiques, macrocytaire dans 18,2 % et microcytaire dans 25,5 % des cas. Une macrocytose isolée était retrouvée dans 8,2 % des cas.

Le bilan étiologique de l'anémie a conclu à un hypersplénisme dans 56,4 % des cas, une carence martiale chez 42,2 % des cas et un déficit en B12 chez un patient (1,4 %).

L'exploration endoscopique a révélé à la fibroscopie digestive haute des varices œsophagiennes grades I dans 11,2 %, des VO grade I-III dans 71,8 %, des varices gastriques dans 11,2 %, une gastropathie hypertensive dans 56,3 %, des érosions dans 29,5 %, un ulcère dans 15,4 %. Une coloscopie a été réalisée chez cinq patients présentant une anémie ferriprive sans cause évidente à la fibroscopie montrant une diverticulose colique dans deux cas, des lésions d'angiodyplasie dans un cas et un aspect normal dans deux cas.

Le stade Child C était plus fréquent chez le groupe des patients ayant une anémie avec une différence significative (25,3 % vs 4,2 %, p = 0,048).

**Conclusion.** La prévalence de l'anémie, dans notre étude, était de 77,5 %. Elle était majoritairement expliquée par l'hypersplénisme et corrélée à une maladie du foie avancée.

## 02-23 Anémie et *Helicobacter pylori* au CHU Yalgado Ouédraogo à Ouagadougou (Burkina Faso)

J. Koulidiati<sup>1</sup>, D. Kabore<sup>2</sup>, M. Nikiema/minoungou<sup>3</sup>, C. Zougrana Traore<sup>4</sup>, SR. Sawadogo/some<sup>1</sup>, A. Bougma<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Hématologie clinique, CHU Yalgado Ouédraogo, Ouagadougou, Burkina Faso ; <sup>2</sup> Hématologie, CHU Yalgado Ouédraogo, Ouagadougou, Burkina Faso ; <sup>3</sup> Laboratoire d'hématologie, CHU Yalgado Ouédraogo, Ouagadougou, Burkina Faso ; <sup>4</sup> Institut des sciences de la santé, Université Nazi Boni de Bobo-Dioulasso au BURKINA FASO., Ouagadougou, Burkina Faso ; <sup>5</sup> Hépatogastro-entérologie, CHU Yalgado Ouédraogo, Ouagadougou, Burkina Faso

**Introduction.** L'infection à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) est incriminée dans la carence en fer et en vitamine B12 sans étiologies retrouvées. Notre étude prospective menée au centre hospitalier universitaire Yalgado Ouédraogo à Ouagadougou (Burkina Faso) avait pour but de rechercher un lien entre l'infection par *H. pylori* et l'anémie dans notre contexte.

**Patients et méthodes.** Ont été recrutés les patients présentant une anémie par carence en fer ou par résistance à un traitement oral par le fer et par carence en vitamine B12 de causes non retrouvées. Une endoscopie digestive haute a été réalisée chez tous ces patients. Un hémogramme a été effectué après un traitement éradicateur de *H. pylori* et une correction en fer ou en vitamine B12.

**Résultats.** Nous avons recruté 31 patients anémiques dont 29 (93,5 %) étaient infectés par *H. pylori*. Chez les 21 patients traités pour anémie par carence en fer et infection par *H. pylori*, le taux d'hémoglobine moyen était passé de 8,72 g/dL à 11,48 g/dL après traitement. Chez les huit patients avec carence en vitamine B12, sept étaient infectés par *H. pylori*. Le taux d'hémoglobine réalisé à la fin du traitement rapportait un taux d'hémoglobine qui variait de 11,3 g/dL à 13,1 g/dL versus un taux d'hémoglobine moyen de 6,84 g/dL.

**Conclusion.** Il existerait un lien entre *H. pylori* et la carence en fer et en vitamine B12 d'étiologies non retrouvées.

## 02-24 Diagnostic biologique des anémies hypochromes microcytaires en pédiatrie : apport de l'équivalent du contenu réticulocytaire en hémoglobine

S. Bahroun<sup>1</sup>, H. Jouini<sup>1</sup>, MA. Jaballah<sup>2</sup>, M. Mallek<sup>2</sup>, R. Dabboubi<sup>2</sup>, T. Messaoud<sup>2</sup>, NEH. Toumi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'hématologie, Hôpital d'enfants Béchir Hamza, Tunis, Tunisie ; <sup>2</sup> Laboratoire de biochimie, Hôpital d'enfants Béchir Hamza, Tunis, Tunisie

**Introduction.** L'anémie microcytaire hypochrome est une pathologie fréquente en pédiatrie. Elle peut être en rapport avec une carence martiale,

une inflammation ou un syndrome thalassémique. Le diagnostic différentiel est basé sur le dosage de la ferritinémie, le bilan inflammatoire et l'électrophorèse de l'hémoglobine. Cependant, lorsque l'anémie est mixte, ces paramètres ne sont plus suffisants.

L'équivalent du contenu réticulocytaire en hémoglobine (RET-He) mesure directement la quantité d'hémoglobine dans les réticulocytes.

On se propose d'évaluer son intérêt dans le diagnostic différentiel de ces anémies.

**Matériels et méthodes.** Il s'agit d'une étude prospective menée sur 39 patients ayant une anémie microcytaire hypochrome arégenerative.

L'hémogramme et la numération des réticulocytes ont été réalisés sur Sysmex<sup>®</sup> XN550 à partir de prélèvements sur tube EDTA. Ces patients ont bénéficié d'un dosage de la ferritinémie (Mindray<sup>®</sup> CL-1200i) et de la CRP (Cobas<sup>®</sup> 6 000) ainsi que d'une électrophorèse de l'hémoglobine. Seuls les patients ayant un profil électrophorétique normal ont été retenus.

La saisie et l'exploitation des données ont été réalisées avec le logiciel Excel2016.

**Résultats.** L'âge moyen était de 2,08 ans (deux mois à cinq ans) et le sex-ratio = 1,6. L'Hb moyenne était de 9,45 g/dL (5,9-11,8 g/dL), la TCMH moyenne de 22,75 pg (13,6 pg-27,4 pg), et le VGM moyen de 70,1 fl (52,4-78,2 fl).

Les 39 patients ont été répartis en trois groupes selon la ferritinémie et la CRP :  
– 9 patients avec ferritinémie basse : anémie ferriprive confirmée : ferritinémie moyenne 8,81 (g/L, RET-He moyen 18,36 pg (13,1 pg-21 pg),  
– 8 patients ayant une ferritinémie et CRP élevées : anémie inflammatoire : CRP moyenne = 22,37 mg/l, ferritinémie moyenne = 304,41 (g/L, RET-He moyen = 25,6 pg (24 pg- 28,4 pg),  
– 22 patients ayant une CRP élevée (moyenne = 35,25 mg/l) mais une ferritinémie normale (moyenne = 45,3 (g/L).

Selon la valeur du RET-He, deux sous-groupes ont été identifiés :

– RET-He rejoint celui des patients avec anémie inflammatoire (5 patients)  
– RET-He rejoint celui des patients avec anémie ferriprive (17 patients)

**Conclusion.** Un RET-He diminué permet de prédire la présence d'une carence martiale. En effet la baisse de ce paramètre est précoce et corrélée à l'épuisement des réserves en fer. Contrairement à la ferritinémie, le RET-He n'est pas influencé par l'inflammation. Son apport permet de mieux préciser le diagnostic des anémies mixtes (ferritinémie normale et CRP élevée). D'autres études sont nécessaires afin de consolider ces résultats et contribuer à la standardisation de ce paramètre.

## 02-25 Mise au point du test de fragilité osmotique en flux pour le dépistage de sphérocytose héréditaire et préparation à l'accréditation du Comité français d'accréditation

V. Bobee\*, E. Brard, C. Conté, C. Boquet, E. Rousseau, B. Colin, L. Igout, C. Boutet, E. Bera, A. Lahary  
Hématologie biologique, CHU Rouen, Rouen

**Introduction.** Le test à l'EMA est actuellement le test de 1<sup>re</sup> intention dans la plupart des laboratoires pour rechercher une sphérocytose héréditaire (SH). Cependant, la littérature décrit environ 10 % des cas qui ne sont pas dépistés par cette technique. Pour augmenter la sensibilité, le test de fragilité osmotique en flux (FOFT) constitue un complément intéressant utilisant les propriétés fonctionnelles des sphérocytes. Nous avons mis en place ce test sur nos deux cytomètres Navios EX (Beckman-Coulter) et préparé un dossier de validation de méthode sur l'approche combinée en 1<sup>re</sup> intention de ces deux tests de portée B basés sur des publications scientifiques.

**Résultats.** Après analyse de 75 échantillons, le seuil de positivité du FOFT a été établi à 8 % de GR résiduels, comparable aux données déjà publiées. Le test était positif dans 16/20 SH, 1/4 anémie immune (test à l'EMA normal), 0/7 drépanocytose majeure, 0/2 elliptocytose, 0/2 stomatocytose, 0/9 thalassémie mineure ou intermédiaire, 0/1 carence en fer, 0/1 déficit en PK, 0/1 CDA. Dans le groupe présentant une hémolyse autre (Cause acquise ou en cours d'exploration), 2/12 étaient positifs avec un test à l'EMA normal, et une éktactométrie a donc été proposée. De façon surprenante, nous avons trouvé 2/16 faux positifs dans le groupe témoin, avec hémogramme, réticulocytes et test à l'EMA strictement normaux. La sensibilité était de 80 % et la spécificité de 94 % dans cette cohorte pour ce test utilisé isolément. En comparaison, le test à l'EMA était positif dans 15/20 SH (sensibilité 75 %) mais il est à noter que trois faux négatifs présentaient une forme particulière de sphéro-elliptocytose, et un autre était dans la zone grise (à contrôler). En combinant les deux tests, seule un sphéro-elliptocytose n'a été détectée par aucune technique, augmentant la sensibilité à 95 %.

Pour le dossier de validation de méthode, nous avons réalisé pour les deux tests des répétibilités sur 10 valeurs et avons obtenu des CV acceptables (< 5% pour le test à l'EMA et < 20 % pour le FOFT). Pour le FOFT, le % de GR résiduels était stable jusqu'à quatre jours après le prélèvement (CV reproductibilité < 20 %) et chutait ensuite. Nous avons étudié la stabilité du mélange réactionnel du FOFT, montrant une diminution du % de GR résiduels dès 10 minutes et confirmant qu'un passage immédiat sur le cytomètre était nécessaire. Pour le test à l'EMA, la stabilité des échantillons

à sept jours a été vérifiée (CV reproductibilité < 6 %). La comparaison des deux cytomètres sur 20 valeurs à ce jour montre une très bonne corrélation pour les deux tests ( $R^2 > 0,96$ ).

En l'absence d'EEQ pour ces deux techniques, nous prévoyons d'effectuer des comparaisons interlaboratoires trois fois par an avec les laboratoires intéressés.

**Conclusion.** L'ajout du Test de Fragilité Osmotique en Flux en 1re intention permet d'augmenter la sensibilité de la recherche de SH. Pour rappel, ce test ne nécessite que l'usage de NaCl et d'eau distillée, ainsi qu'un cytomètre dont disposent déjà les laboratoires réalisant le test à l'EMA. En cas de discordance, les résultats sont à confronter aux autres éléments clinicobiologiques afin de proposer une éktacytométrie.

Ce travail démontre qu'il est possible de répondre aux exigences de l'accréditation COFRAC pour ces analyses spécialisées bien que le développement d'échanges interlaboratoires soit nécessaire pour évaluer l'exactitude.

## 02-26 Caractéristiques clinicobiologiques de la maladie de Biermer

A. Fraj\*, S. Arfa, I. Hamdi, O. Berriche, MH. Sfar

Service de médecine interne et d'endocrinologie, Hôpital Universitaire Tahar Sfar, Mahdia, Tunisie

**Introduction.** La maladie de Biermer (MB) est une gastrite atrophique auto-immune à l'origine d'une carence en vitamine B12 liée à la présence d'anticorps dirigés contre le facteur intrinsèque.

Le but de cette étude est de déterminer les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques de la MB.

**Patients et méthodes.** Il s'agit d'une étude rétrospective colligeant tous les dossiers de patients atteints de MB hospitalisés dans un service de médecine interne entre 2000 et 2019.

**Résultats.** Nous avons colligé 25 cas de MB (13 hommes et 12 femmes) d'âge moyen 62 ans [31 ans-91 ans]. Le mode de révélation de la maladie était polymorphe : syndrome anémique dans 21 cas (84 %), signes neurologiques dans six cas (24 %), signes digestifs dans deux cas (8 %), syndrome infectieux dans un cas (4 %) et syndrome hémorragique dans un cas (4 %).

Quatre patients (16 %) avaient des antécédents de pathologie auto-immune (dysthyroïdie auto-immune dans trois cas : 12 %, diabète de type 1 : 4 %, vitiligo un cas : 4 %).

Un neuro-Biermer (13 cas) comprenait une sclérose combinée de la moelle dans trois cas (12 %), une neuropathie périphérique dans cinq cas (20 %), un syndrome cordonal postérieur dans cinq cas (20 %) et un syndrome cérébelleux dans un cas (4 %). Une imagerie cérébrale était faite dans trois cas, était en faveur d'une myélite.

Les anomalies biologiques comportaient : une anémie macrocytaire dans 20 cas (80 %) avec un taux moyen d'hémoglobine était de 6,5 g/dL et volume globulaire moyen de 117 dL. Une pancytopenie était trouvée dans 16 cas (64 %). La vitamine B 12 sérique était basse dans tous les cas. Une mégaloïdostose médullaire, une gastrite atrophique et une positivité de bilan immunologique (anticorps anti-cellules pariétales ou anti-facteur intrinsèque) étaient présentes dans respectivement 18, sept et quatre des cas. Dix patients (40 %) avaient nécessité une transfusion devant des signes d'intolérance de l'anémie. L'évolution clinique et biologique était favorable sous vitaminothérapie.

**Discussion.** La maladie de Biermer est une gastrite atrophique auto-immune, à prédominance fundique, responsable d'une carence en vitamine B12 par malabsorption de cette dernière. Elle est caractérisée par la présence d'anticorps anti-facteur intrinsèque. C'est la cause la plus fréquente de déficit en vitamine B12. Dans notre série, le diagnostic d'une MB était retenu vu le terrain des patients (âge, auto-immunité) même en absence d'une confirmation immunologique ou histologique.

Les manifestations cliniques de cette anémie sont multiples et très polymorphes. Les troubles hématologiques, neurologiques et digestifs sont généralement au premier plan.

**Conclusion.** En plus de sa présentation classique habituelle, la MB doit être recherchée devant tout symptôme neurologique ou biologique atypique étant donné la réversibilité des signes sous vitaminothérapie. Notre étude a permis de montrer le caractère polymorphe et non spécifique des signes cliniques et biologiques liés à la MB, ce qui rend difficile à établir le diagnostic positif.

## 02-27 Aspects cytologiques des anémies mégaloïdostiques : à propos de 65 cas

N. Fekih-Mrissa<sup>1</sup>, S. Bouzidi<sup>2</sup>, A. Nasr<sup>2</sup>, S. Layouni<sup>1</sup>, S. Mahfoudh<sup>2</sup>, M. Bouguerra<sup>2</sup>, B. Nsir<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Unité de recherche de biologie moléculaire (UR17DN06), laboratoire d'hématologie, Hôpital militaire de Tunis, Tunis, Tunisie ; <sup>2</sup> Laboratoire d'hématologie, Hôpital militaire de Tunis, Tunis, Tunisie

**Introduction.** Les anémies macrocytaires carencielles sont dues à une carence en vitamine B12 et/ou en acide folique. Notre travail a pour

objectif d'établir les paramètres épidémiologiques, cliniques et hématologiques des anémies mégaloïdostiques.

**Patients et méthodes.** Il s'agit d'une étude descriptive rétrospective menée au laboratoire d'hématologie de l'Hôpital Militaire Principal d'Instruction de Tunis s'étalant sur quatre ans (janvier 2016-décembre 2019) incluant les patients diagnostiqués avec anémie mégaloïdostique. Diverses données ont été recueillies pour chaque sujet : épidémiologiques (âge, sexe, service d'hospitalisation et antécédents médicaux), cliniques et hématologiques (hémogramme et étude du myélogramme avec la coloration de May-Grünwald Giemsa). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de Microsoft Excel 2010.

**Résultats.** L'étude a inclus 65 patients avec un sex-ratio M/F = 1,03. L'âge moyen des patients au moment du diagnostic était de 54,8 ans (extrêmes de 27 et 83 ans). Les signes cliniques étaient dominés par les signes digestifs (46 %) : Glossite, vomissements, amaigrissement, épigastalgies, suivi par les signes neuropsychiatriques (41 %), le syndrome anémique (28 %) et l'altération de l'état général (15 %). L'étude de l'hémogramme montrait une anémie chez 93,8 % des patients avec un taux moyen d'hémoglobine de 8,4 g/dL (extrêmes de 3,3 à 14,5 g/dL). La macrocytose était présente chez 72,1 % des sujets. Une anémie isolée était retrouvée dans 48,3 % des cas, une bicytopenie dans 49,1 % des cas, et une pancytopenie dans 20,7 % des cas. Les anomalies observées au niveau du myélogramme comportaient une mégaloïdostose médullaire (89,2 %), un gigantisme cellulaire (58,5 %), des métamyélocytes à noyau en fer à cheval (47,7 %), des signes de dysérythropoïèse (46,1 %), et une hypersegmentation des noyaux des polynucléaires neutrophiles (18,5 %).

**Conclusion.** Notre étude a permis de mieux cerner les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et hématologiques de l'anémie mégaloïdostique. Cependant d'autres examens comme les bilans biochimiques, immunologiques et l'examen endoscopique restent indispensables pour confirmer la carence vitaminothérapeutique et établir le diagnostic étiologique.

## 02-28 Les anémies carencielles chez le sujet âgé

A. Fraj\*, R. Amri, W. Garbouj, I. Chaabene, H. Tounsi

Service de médecine interne, Hôpital Universitaire Mohamed Tahar Maamour, Nabeul, Tunisie

**Introduction.** L'anémie est très souvent rencontrée en gériatrie et insuffisamment traitée car trop souvent banalisée ou interprétée faussement comme une conséquence physiologique du vieillissement. C'est une cause de morbidité et de mortalité surajoutée chez le sujet âgé. L'origine carencielle occupe une place importante parmi les étiologies de l'anémie chez la personne âgée. Notre objectif est de déterminer les caractéristiques des anémies carencielles chez les sujets âgés.

**Patients et méthodes.** Une étude rétrospective sur une période de quatre ans [2016-2019] qui intéresse 52 patients hospitalisés dans un service de médecine interne pour anémie. 24 avaient une anémie d'origine carencielle (46 %).

**Résultats.** Il s'agissait de 13 hommes et 11 femmes avec sex-ratio à 1,18. L'âge moyen était de 74 ans avec des extrêmes variant entre 65 et 93 ans. La quasi-totalité des patients était symptomatique (85 %) et six cas ont présenté des signes de gravité : dyspnée de repos dans quatre cas, angor dans deux cas, syncope dans deux cas. Les autres symptômes présentés par les patients étaient comme suit : vertige dans huit cas, tachycardie dans six cas, dyspnée d'effort dans cinq cas, lipothymie dans deux cas, céphalée dans un cas.

Le taux le plus bas d'hémoglobine était à 3 g/dL avec un taux moyen à 6,2 g/dL. L'anémie était microcytaire dans 17 cas (70 %), normocytaire dans deux cas (8 %) et macrocytaire dans cinq cas (20 %).

Il s'agissait d'une anémie ferriprive par carence d'apport dans 14 cas, un déficit en folates dans neuf cas et un déficit en vitamine B12 dans cinq cas. Une carence mixte a été notée dans huit cas.

Dix patients ont nécessité une transfusion (41 %) avec une moyenne de 2,1 culots globulaire avec évolution favorable dans 91 % des cas. L'hémoglobine post-transfusionnelle était en moyenne à 7,2 g/dL. Tous nos patients ont été mis sous traitement martial.

**Conclusion.** L'anémie du sujet âgé est souvent multifactorielle, d'où la nécessité d'un bilan étiologique exhaustif avant de retenir l'origine carencielle, tout en insistant sur l'importance d'un traitement adapté à la qualité de vie.

## 02-29 Intérêt des biopsies duodénales systématiques dans l'exploration des anémies ferriprives

L. Chtourou<sup>1</sup>, H. Smaoui<sup>1</sup>, M. Houidi<sup>1</sup>, H. Gdoura<sup>1</sup>, M. Boudabbous<sup>1</sup>, M. Ghorbel<sup>2</sup>, M. Mdhafer<sup>2</sup>, M. Elloumi<sup>2</sup>, A. Amouri<sup>1</sup>, L. Mnif<sup>1</sup>, N. Tahri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Service de gastro-entérologie, CHU Hédi Chaker, Sfax, Tunisie ; <sup>2</sup> Service d'hématologie, CHU Hédi Chaker, Sfax, Tunisie

**Introduction.** La malabsorption intestinale par atrophie villositaire duodénale représente l'une des étiologies digestives des anémies

ferriprives. L'objectif de notre travail est d'étudier l'apport des biopsies duodénales systématiques dans l'exploration des anémies ferriprives, lorsque l'endoscopie digestive haute est macroscopiquement normale.

**Matériels et méthodes.** Il s'agissait d'une étude rétrospective durant une période de quatre ans menée dans un service de gastro-entérologie. Nous avons colligé tous les patients présentant une anémie ferriprive et explorés par une endoscopie digestive haute qui s'est révélée normale. Pour ces patients des biopsies duodénales systématiques étaient effectuées à la recherche d'une atrophie villositaire histologique. Les données ont été saisies et analysées par un logiciel SPSS.

**Résultats.** Nous avons colligé 242 patients étaient inclus dans cette étude. Il s'agissait de 168 femmes (69 %) et 74 hommes (31 %). L'âge

moyen était de 45,28 ans ( $\pm 19,1$  ans). Aucun patient n'avait des symptômes digestifs. Le taux moyen d'hémoglobine (Hb) était à 9,6 g/dL, le taux moyen du volume globulaire moyen (VGM) était à 74,4 fL. La fibroscopie œsogastroduodénale était pratiquée chez tous les patients. Elle n'avait montré aucune lésion digestive dans tous les cas. Les biopsies gastriques systématiques étaient pratiquées chez tous les patients. Ces biopsies étaient normales chez 216 patients (89,3 % des cas) et avaient montré une atrophie villositaire histologique chez 26 patients (10,7 % des cas).

**Conclusion.** Notre étude conclut que les biopsies duodénales systématiques au cours d'une endoscopie digestive haute sont nécessaires au cours de l'exploration des anémies ferriprives.