

Chantal FOSSAT, Marie ROMÉO *

Schizocytes : recherche et interprétation

RÉSUMÉ

La découverte orientée ou fortuite de schizocytes sur un frottis sanguin est fréquente en Biologie Médicale. Témoin d'une fragmentation mécanique du globule rouge, elle doit toujours être interprétée en fonction du contexte clinico-biologique du patient. Les critères d'identification des schizocytes sur frottis sanguins doivent être rigoureux, permettant d'éliminer les artefacts et d'affirmer ou non la présence de schizocytes. Les automates d'hémocytométrie peuvent apporter une orientation grâce à des alarmes morphologiques dont il convient de connaître les limites.

L'importance de la mise en évidence d'une schizocytose circulante réside dans la précocité de cette cytologie au cours de situations cliniques où le pronostic vital est engagé telles que les microangiopathies thrombotiques qui dominent ce tableau par leur gravité.

MOTS CLÉS

Schizocytes, anémie hémolytique, microangiopathie thrombotique

Schizocytes : research and interpretation

SUMMARY

Schizocytes, common morphological finding in peripheral blood films must be evaluated according to the others clinical and laboratory data. Presence of haemolytic anemia, schistocytosis and unexplained thrombocytopenia should alert the possibility of thrombotic thrombocytopenic syndrome which contribute to mortality and morbidity. Red blood cell fragmentation is often the earliest sign of thrombotic microangiopathy with severe prognosis. Microscopic evaluation must be monitored closely in order to determine the incidence and severity of schistocytosis. Until now sensibility and specificity of automated methods have not been well evaluated.

KEYWORDS

Schizocytes, haemolytic anemia, thrombotic thrombocytopenic syndrome

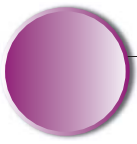
I - Introduction

La recherche de schizocytes est une situation fréquente pouvant revêtir un caractère d'urgence. Retenons que la période néonatale passée et en l'absence de pathologie constitutionnelle du globule rouge (GR), la présence de schizocytes est anormale. Résultant d'une fragmentation mécanique des GR, ils se rencontrent dans des contextes clinico-biologiques variés au sein desquels les syndromes de microangiopathie thrombotique (MAT) dominant par leur gravité et par l'urgence de la prise en charge thérapeutique. La quantification d'une schizocytose circulante impose une lecture rigoureuse des frottis sanguins.

II – Circonstances de découverte

Parfois orientée par une prescription médicale, il peut s'agir d'une découverte fortuite du laboratoire, chez un adulte ou chez un enfant, à l'occasion du contrôle d'une anomalie de l'hémogramme sur frottis sanguin. Le tableau clinique est de sévérité variable. C'est le début brutal de la maladie associant fièvre, anémie hémolytique, thrombopénie, manifestations neurologiques et insuffisance rénale qui représente la forme grave imposant une prise en charge en urgence.

*Laboratoire d'Hématologie Pr I. Juhan - CHU Timone - Rue St Pierre - 13385 Marseille cedex 5
Tél.: 04 91 38 60 49/51 – Fax : 04 91 94 23 32 – E-Mail : chantal.fossat@ap-hm.fr



III – Physiopathologie

La fragmentation érythrocytaire s'observe dans des situations variées, qu'il s'agisse d'un effet secondaire lié à une fragilité érythrocytaire, de macro ou de microangiopathies.

- Chez le nouveau-né, en particulier le prématuré et au cours de la période néonatale, la présence de picnocytes / schizocytes est la règle. On peut en trouver jusqu'à 5% à l'âge de 3 mois.
- En présence d'une pathologie constitutionnelle (anomalie du cytosquelette : chaîne de spectrine, protéine 4.1, dysérythropoïèse congénitale) ou acquise (carence en fer, en vitamine B12) du GR, c'est la fragilité érythrocytaire liée à une érythropoïèse peu efficace qui entraîne la fragmentation des hématies.

La morphologie des GR est alors dominée par une grande aniso-poïkilocytose, associant schizocytes à d'autres aspects morphologiques tels que des elliptocytes, annulocytes, cellules cibles, sphérocytes.

- Il peut s'agir d'une fragmentation mécanique sur une valve cardiaque désinsérée, un circuit de dialyse ou de circulation extra corporelle. La présence de schizocytes, témoin du dysfonctionnement est responsable d'une hémolyse intravasculaire qui ne présente en général aucun critère de gravité majeur.
- Lors des chocs palmoplantaires répétés des marathoniens, lors d'une élévation de température brutale chez les brûlés, on observe également des schizocytes.

Mais, ce sont les phénomènes d'activation-lésion endothéliale, qui représentent les formes graves regroupant les MAT.

Le développement d'une hyperagrégabilité plaquettaire favorise la formation de thrombi plaquettaires, et le dépôt de filaments de fibrine à l'origine de la formation de schizocytes.

Le rôle des infections dans le déclenchement d'un

épisode de MAT est vraisemblable. Différents agents infectieux (*Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*) ont été retrouvés pendant la phase aiguë. Ce sont ces antigènes qui activent ou endommagent la paroi endothéliale des vaisseaux. De nombreux médiateurs de la réaction inflammatoire sont libérés, activant l'adhésion des polynucléaires neutrophiles (PN), la libération de substances proagrégantes endothéliales, en particulier les mégamultimères de facteur Willebrand (MMW) et du platelet activating factor (PAF). Ces phénomènes aboutissent à un état de proagrégabilité plaquettaire qui va persister anormalement chez certains individus présentant des facteurs prédisposant.

IV – Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique de schizocytose repose sur l'observation en microscopie optique, d'un frottis sanguin coloré au May-Grunwald-Giemsa (MGG). Le dépistage par les automates d'hémocytométrie reste mal évalué.

1. Définition

Les schizocytes présentent des formes très variées et il n'existe pas de définition stricte. Ce sont évidemment toujours des microcytes. Le rapport surface/volume est en principe normal. Les autres paramètres dépendent de la taille du fragment cellulaire et de la pathologie à laquelle il est associé. Le travail collégial du Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC), coordonné par J. F. Lesesve (1), retient, comme notion essentielle de reconnaissance, la mise en évidence de fragments d'érythrocytes présentant des lignes de cassure et au moins 2 angles aigus.

Les aspects cytologiques retenus sont donc des formes en triangle (*figure 1 a*), en casque (*figure 1*

Cet article constitue l'adaptation d'un atelier «Schizocytes recherche et interprétation» du XXXIII^e colloque du SNBH (Pau, 2004)

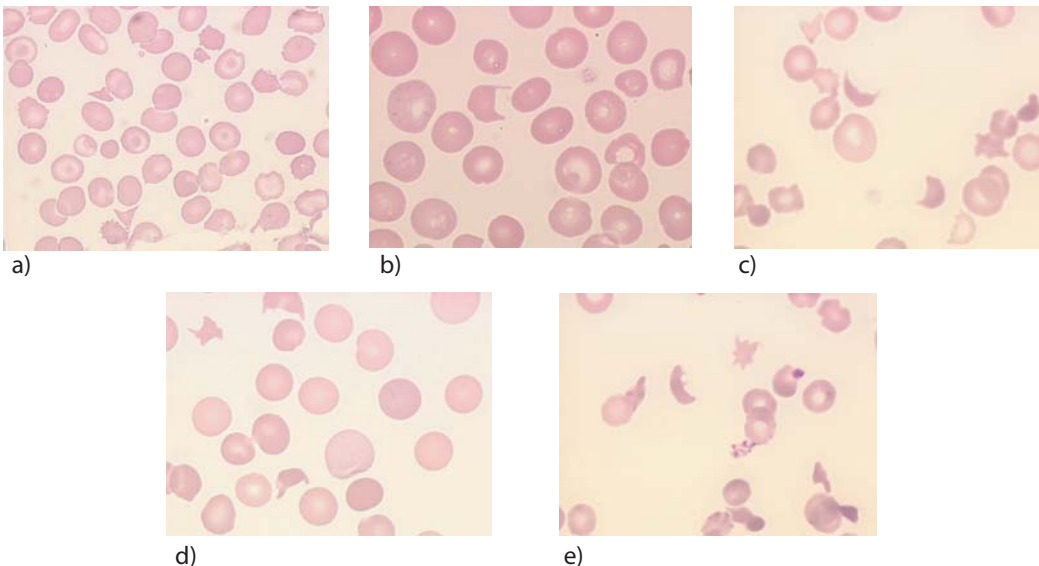
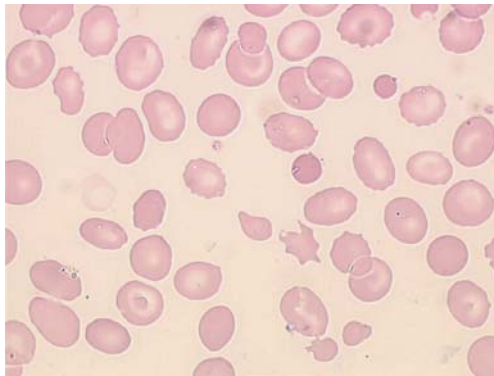


Figure 1
Aspects cytologiques des schizocytes : **a** : formes en triangle, **b** : formes en casque, **c** : formes en croissant de lune, **d** : formes en tête de chat, **e** : formes en chapeau de gendarme

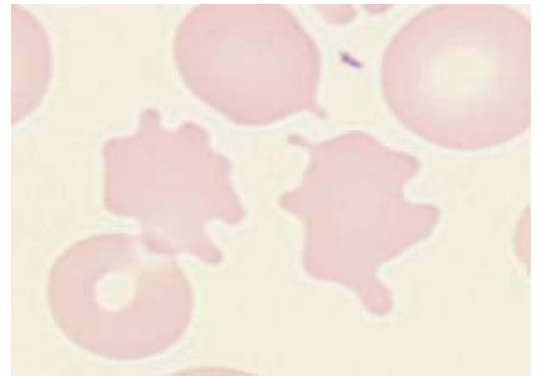
Schizocytes : recherche et interprétation

Figure 2

Aspects cytologiques à éliminer : **a** : hématies spiculées, **b** : hématies crénelées



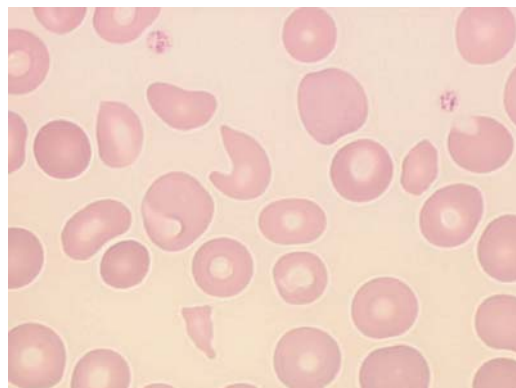
a)



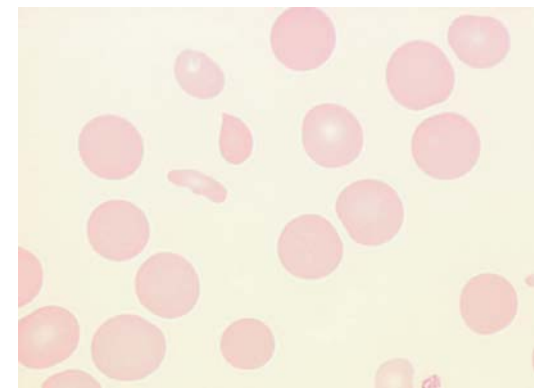
b)

Figure 3

Aspects cytologiques à discuter : **a** : hématies mordues, **b** : hématies en bâtonnet



a)



b)

b), en croissant de lune (figure 1 c), en tête de chat (figure 1 d). Il convient d'éliminer formellement les aspects crénelés et spiculés (figure 2 a, b), tandis que les hématies mordues, en virgule, en bâtonnet sont discutables (figure 3 a, b).

Les schizocytes très fragiles se transforment rapidement en sphéro-schizocytes (figure 1 e) qui hémolysent rapidement. Témoin d'un phénomène ancien, ils perdent leur capacité de déformabilité et sont séquestrés dans les capillaires spléniques avant d'être phagocytés.

2. Réalisation Pratique

2.1 - Microscopie optique

Les frottis sanguins doivent être fins, bien étalés et colorés au M.G.G à pH neutre ou discrètement acide. C'est classiquement le deuxième tiers externe du frottis qui est considéré comme la zone de lecture la plus représentative. Il faut éviter les bordures et les franges du frottis où les GR ont tendance à se sphériser sous l'influence des contraintes d'étalement.

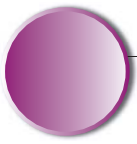
Il est souhaitable de réaliser cette détermination sur un grand nombre d'hématies (1000 à 5000). Plusieurs observateurs doivent régulièrement confronter leurs résultats pour homogénéiser les lectures au sein d'un même laboratoire. L'expression des résultats doit tenir compte de l'ensemble du contexte biologique et clinique du patient

Lorsque la présence de schizocytes fait partie d'une anisopoïkilocytose érythrocytaire globale, une appréciation qualitative (rares, nombreux, très nombreux ou +/++/+++) associée à un commentaire peut être suffisante, pour orienter le diagnostic.

Lorsque la présence de schizocytes domine la morphologie des GR, qu'elle est associée à d'autres signes clinico-biologiques évocateurs de MAT, il est indispensable d'évaluer le pourcentage de schizocytes. Un seuil de positivité interprétable peut être fixé entre 0,2 et 0,5%.

2.2 - Automates d'hémocytométrie

L'alarme morphologique « globules rouges fragmentés » peut servir de dépistage. La sensibilité et la spécificité sont encore mal évaluées en pratique quotidienne. Les automates, analysant un grand nombre d'événements (>10000) par échantillon, devraient être très performants à condition d'avoir un mode de reconnaissance fiable. Ce dernier repose sur l'étude du volume des particules mesuré par impédance ou diffraction de la lumière dans le canal d'analyse des plaquettes/GR, et sur l'aspect des courbes de répartition cellulaire qui en résultent. Certains automates réalisent une analyse biparamétrique en ajoutant l'analyse du contenu cellulaire réalisé par l'étude de la diffraction du rayonnement lumineux à différents angles ou l'étude du contenu en ARN par fluorescence. Ainsi, les alarmes «SCH» (Horiba ABX, France),



«schizo» (Beckman-Coulter, Etats-Unis) sont déclenchées si le nombre de particules de la zone 18-26 ou 1-30 fL est trop important par rapport au nombre total de plaquettes.

L'alarme « GR fragmentés » (Bayer, Etats-Unis) est déclenchée si le nombre d'événements de la zone 1-60 fL avec indice de réfraction <1,35 est supérieur à 100 000/ μ L.

L'alarme «schizo» (Cell dyn, sapphire) (Abbott, Etats-Unis) est déclenchée si une discordance est trouvée entre la numération par impédance et par analyse d'une lumière polarisée à 2 angles (7° et 90°).

L'alarme «schizo» (Sysmex, Japon) est déclenchée si une discordance est trouvée entre la numération par impédance et l'analyse du contenu en ARN.

La sensibilité et la spécificité de ces alarmes sont encore mal connues. Il existe des faux négatifs, lorsque le % de schizocytes est faible et des faux positifs en cas d'hyperplaquettose, d'agrégats plaquettaires, de grandes plaquettes, de fragments de cytoplasme leucocytaire dans certaines hémopathies, de précipités de cryoglobulines, de chylomicros circulants, etc....

V – Diagnostic étiologique

Rechercher l'étiologie d'une schizocytose est indispensable. Après avoir éliminé toutes les causes secondaires de schizocytose associée à une anisopoikilocytose sanguine, les causes de macroangiopathies des gros vaisseaux, post chirurgicales et transitoires, ce sont les MAT qui regroupent un ensemble de pathologies caractérisées par l'association d'une anémie hémolytique mécanique, thrombopénie périphérique, et de défaillance viscérales de sévérité variable qui sont des urgences vitales. Les 2 types de MAT les plus classiques sont le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT, syndrome de Moschowitz) (2) caractérisé par une atteinte le plus souvent viscérale, et le syndrome hémolytique et urémique (SHU) où l'atteinte rénale est prédominante. Il existe d'autres situations où un MAT peut s'observer.

Le PTT est une forme particulièrement grave, pouvant s'accompagner d'une défaillance multiviscérale. On distingue le PTT sporadique qui guérit définitivement, le PTT récidivant caractérisé par des rechutes régulières et fréquentes et le PTT intermittent caractérisé par des rechutes intermittentes. Il est admis que le facteur Von Willebrand (FvW) a un rôle majeur dans la physiopathologie du PTT. Au moment de l'épisode de PTT, le plasma contient de grandes quantités de mégamultimères de FvW (MMW) disparaissant dans les cas de PTT sporadique, persistant dans les PTT récidivant même pendant les phases de rémission. L'hypothèse d'une protéine régulant la taille des MMW et dont le déficit transitoire ou permanent serait responsable de PTT sporadique ou récidivant a été confirmée (3). C'est la métalloprotéase ADAMTS13 qui clive spécifiquement les MMW en multimères de bas

poids moléculaire (PM). Dans le PTT sporadique, le déficit en protéase est lié à la présence d'un inhibiteur plasmatique (IgG) qui disparaît ou persiste dans les formes intermittentes.

Chez l'adulte, le déficit en ADAMTS13 est associé en général à la présence d'un auto-Ac inhibiteur plasmatique (4). Chez l'enfant le déficit est le plus souvent constitutionnel (5). Cinquante mutations du gène codant l'ADAMTS13 en 9q34 sont connues. Il n'existe aucune relation entre la gravité des PTT et le génotype, suggérant l'intervention d'autres facteurs pour expliquer la variabilité phénotypique.

Deux types de SHU peuvent être individualisés : le SHU post diarrhéique, encore appelé SHU épidémique, se rencontre le plus souvent chez le nourrisson et le grand enfant. Le SHU atypique survenant en dehors d'un contexte de gastro-entérite. La physiopathologie est basée sur l'existence d'une coagulation intra vasculaire localisée dans la microcirculation rénale.

Le SHU post diarrhéique est déclenché par des entérobactéries sécrétrices de toxines : *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* O157 :H7 essentiellement. Ces toxines sont susceptibles à elles seules d'induire des lésions endothéliales et d'activer les plaquettes. Chez l'homme, les récepteurs des toxines se situent pour l'essentiel sur les cellules endothéliales du cortex et de la médulla rénale.

La physiopathologie du SHU atypique reste mal comprise. Chez l'adulte, des virus, bactéries, médicaments pourraient le déclencher. Chez l'enfant, il est associé à une consommation persistante de la fraction 3 du complément qui pourrait être associée à un déficit en facteur H du complément synthétisé par le foie et codé par un gène en 1q32 (6). Récemment des déficits acquis en facteur H par auto-anticorps ont été documentés.

Mais on peut rencontrer une MAT dans d'autres circonstances : au cours de la grossesse ou du post-partum, au cours de pathologies auto-immunes telles que le lupus érythémateux disséminé, le syndrome des anti-phospholipides, après greffes de cellules souches hématopoïétiques (7), chez les sujets infectés par le VIH (8), chez des patients atteints de cancer, associé à une prise médicamenteuse. De nombreuses classes de médicaments ont été rendus responsables de MAT. La « Food and Drug Administration » cite une enquête menée de 1991 à 1997 impliquant les Thiényridines (ticlopidine et clopidogrel) (9), des hypocholestérolémiants (statines), des antibiotiques (rifampicine), des anti-inflammatoires (ibuprofène), des produits de contraste iodés, des immunosuppresseurs (ciclosporine, tacrolimus), des anticancéreux (mitomicine C, cisplatine, bléomycine, gemcitabine) rendant souhaitable la recherche de schizocytes après 4 cures de mitomicine C (10), par exemple.

VI - Examens complémentaires

L'anémie est profonde, régénérative (réticulocytes > 120 G/L) à Coombs négatif.

L'hémolyse est caractérisée par des taux de bilirubine libre et de LDH élevés et par un taux d'haptoglobine sérique effondré.

La thrombopénie est constante, souvent inférieure à 20 G/L. L'hémostase est souvent normale, hormis les D-Dimères discrètement élevés.

Une hyperleucocytose composée de polynucléaires neutrophiles est fréquente.

Les autres examens complémentaires incluent un ionogramme sanguin et urinaire, l'évaluation du débit de filtration glomérulaire, le dosage de la protéinurie des 24h et une étude du sédiment urinaire.

La recherche d'un processus infectieux ayant pu être le facteur déclenchant est systématique.

La recherche d'autoanticorps (antinucléaires) peut être utile puisque leur positivité est le plus souvent associée à un déficit sévère acquis en ADAMTS13.

L'étude de l'activité ADAMTS13 doit être systématiquement réalisée chez l'enfant afin de ne pas méconnaître un PTT congénital. Chez l'adulte l'intérêt du dosage est en cours d'évaluation.

Le dosage des fractions C3 et C4 du complément est utile en cas de SHU. L'histologie rénale est parfois utile.

VII - Conclusion

La mise en évidence de schizocytes sur frottis sanguin doit impérativement être considérée comme anormale. Après avoir validé la découverte, le laboratoire en étroite relation avec le clinicien doit permettre d'orienter la recherche de l'étiologie qui peut être une urgence vitale dans des circonstances bien définies.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) LESEVE JF., FENNETEAU O., CYNBER T., LECOMPTE T., GRANGE M. J., FLANDRIN G., TROUSSARD X., et le GFHC. Rôle du biologiste confronté à la recherche de schizocytes. *Ann. Biol. Clin.* 2003, 61,505-512.
- (2) MOSCHOWITZ E. An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries : an undescribed disease. *Archives of internal Medicine*, 1925, 36, 294-310.
- (3) MOAKE JL. VON WILLEBRAND factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol*, 2004,41,4-14.
- (4) COPPO P., BENGOUFA D., VEYRADIER A., WOLF M., BUSSEL A., MILLOT GA., et al. For the Réseau d'Études des microangiopathies thrombotiques de l'Adulte. Severe ADAMTS 13 deficiency in adult idiopathic thrombotic microangiopathies defines a subset of patients characterized by various autoimmune manifestations, lower platelet count and mild renal involvement. *Medecine*, 2004,83,233-244.
- (5) PIMANDA JE., MAEKAWA A., WIND T., PAXTON J., CHESTERMAN CN., HOGG PJ. Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura in association with a mutation in the second CUB domain of ADAMTS13. *Blood*, 2004, 103, 627-629.
- (6) CAPRIOLI J., BETTINAGLIO P., ZIPFEL., et al. Italian registry of familial and recurrent HUS/TTP. The molecular basis of familial uremic syndrome : mutation analysis of factor H gene. *J. Am Soc Nephrol*, 2001;12:297-307.
- (7) ROY V, RIZVI MA, VESELY SK, GEORGE JN. Thrombotic-thrombocytopenic purpura-like syndromes following bone marrow transplantation: an analysis of associated conditions and clinical outcomes. *Bone Marrow Transplant*, 2001, 27, 641-646.
- (8) MOORE RD. Schistocytosis and a thrombotic microangiopathy-like syndrome in hospitalized HIV-infected patients. *Am J. Hematol*, 1999, 60,116-120.
- (9) BENNET CL., CONNORS JM., CARVILLE JM., MOAKE JL., BELL WR., Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N Engl. J. Med.*, 2000, 342,1773-1777.
- (10) NISHIYAMA Y., KOMABA Y., KITAMURA H., KATAYAMA Y. Hemolytic uremic syndrome with intracranial hemorrhage following mitomycin C administration. *J. Intern. Med.*, 2001, 40, 237-240.