

## EVALUATION DE L'ANEMIE MACROCYTAIRE CHEZ UNE POPULATION FEMININE DANS LA REGION DE SETIF

Reçu le 30/11/2002 – Accepté le 06/03/2004

### Résumé

10 observations de cas féminins du service d'hématologie sont rapportées. 6 malades avaient toutes une anémie macrocytaire avec un médullogramme témoignant d'une mégablastose. L'examen attentif du frottis sanguin permet de mettre en évidence des anomalies morphologiques cellulaires qui oriente le diagnostic : anisocytose érythrocytaire, poikilocytose, présence de ponctuations basophiles, anomalies de segmentation, de granulation ou de condensation de la chromatine des polynucléaires neutrophiles.

La concentration moyenne en hémoglobine est de  $9.08 \pm 1.68$  g/dl, le volume globulaire moyen est de  $99.57 \pm 11.59$  fL, le nombre des globules blancs correspond à  $2.93 \pm 0.61 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ . Les taux des folates sériques et érythrocytaires sont  $10.01 \pm 2.5$  et  $298 \pm 44.79$  ng/ml respectivement. Chez toutes les patientes, les taux des folates sériques et érythrocytaires sont normaux. L'anémie mégablastique est dépistée entre 1984 - 2000, le nombre de cas de patients atteints de cette anémie est plus élevé chez les femmes que les hommes ( $p < 0.001$ ).

**Mots clés:** anémie macrocytaire, acide folique, vitamine B12, dosage microbiologique.

### Abstract

We report ten cases in women of hematological service. 6 women had macrocytic anaemia with megaloblasts evident on medullogram. During blood film examination, cell abnormalities have to be notified, i.e. anisocytosis, poikilocytosis of red cells, morphological abnormalities of neutrophils including hypogranulation, hypolobulation.

The mean hemoglobin level was  $9.08 \pm 1.68$  g/dL, the mean cell volume was  $99.57 \pm 11.59$  fL, the white blood cell count  $2.93 \pm 0.61 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ . Serum and erythrocyte folates levels were  $10.01 \pm 2.5$  and  $298 \pm 44.79$  ng/ml respectively. In all patients serum and erythrocyte folates were normal. Megaloblastic anemia was detected between 1984 - 2000, patients with megaloblastic anemia had a women of onset compared with men ( $p < 0.001$ ).

**Keywords:** macrocytic anaemia, folic acid, vitamin B12, microbiologic assay.

B. HOUCHER<sup>1</sup>

D. NAIMI<sup>2</sup>

S. BEGAG<sup>1</sup>

A. BOUZIDI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie Cellulaire

Département de Biologie

Faculté des Sciences

Université de Sétif

Sétif 19000 (Algérie)

<sup>2</sup> Laboratoire de Biologie-

Physiologie Cellulaire

Département de Biologie

Faculté des Sciences

Université de Constantine

Constantine 25000 (Algérie)

### ملخص

تمت ملاحظة 10 حالات نسوية بمصلحة علم الدم بحيث 6 مريضات كانت مصابة بأنيميا الخلايا العملاقة (macrocytaire) بحيث يشهد médullogramme على وجود (mégablastose). مكنت الملاحظة الدقيقة للمسحة الدموية من معرفة وجود تغيرات مورفولوجية خلوية للكريات الحمراء بحيث تتمثل في تنوع الأحجام (anisocytose) والأشكال (poikilocytose) ووجود حبيبات قاعدية وتغيرات شكلية في إنقسام أو تكثيف كروماتين الكريات البيضاء المتعادلة والمتعددة الفصوص.

قدر التركيز المتوسط للهيموغلوبين  $9.08 \pm 1.68$  غ/دسل والحجم الخلوي المتوسط  $99.57 \pm 11.59$  فننتو لتر و قدر عدد الكريات البيضاء  $2.93 \pm 0.61 \cdot 10^3/\text{م}^3$ . كما قدرت كميات فولات المصل والكريات الحمراء على التوالي  $10.01 \pm 2.5$  و  $298 \pm 44.79$  نغ/مل. يعتبر تقدير كميات فولات المصل والكريات الحمراء عند جميع المريضات عاديا. تبين من معاينة أنيميا خلايا النخاع العملاقة (mégablastique) بين 1984 - 2000 أن عدد حالات المرضى المصابون بهذه الأنيميا أنه يرتفع أكثر عند النساء وهذا مقارنة مع الرجال ( $p < 0.001$ ).

**الكلمات المفتاحية:** أنيميا الخلايا العملاقة، حمض الفوليك، فيتامين B12، معايرة ميكروبيولوجية.

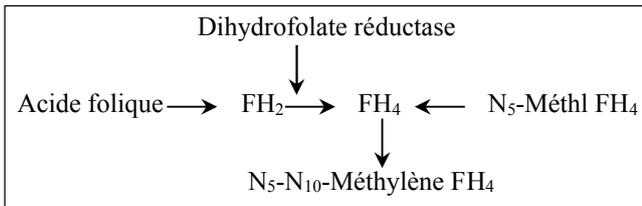
Les carences en folates sont fréquemment observées, même dans les pays fréquemment observées, même dans les pays industrialisés [1]. Les populations les plus exposées sont les jeunes enfants, les femmes en âges de procréer, les femmes enceintes et les sujets âgés. Certaines maladies digestives (diarrhées, maladie coeliaque, maladie de Crohn, résections intestinales) peuvent induire une carence en folates. La carence en folates constitue l'étiologie de certaines anémies macrocytaires. Le diagnostic de routine repose sur la détermination des folates sériques et érythrocytaires [2].

La vitamine B12 et les folates sont deux vitamines interdépendantes sur le plan métabolique et dont la carence entraîne une anémie macrocytaire voire mégablastique, mais aussi des troubles neurologiques et digestifs [3].

Les anémies macrocytaires sont définies par un volume globulaire moyen (VGM) des hématies égale à 100 fL [4] ou qui dépasse 100 fL [5,6,7]. Elles peuvent être régénératives dans la suite d'une hémolyse aiguë [5] ou arégénératives et alors souvent associées à une mégablastose médullaire, caractérisée par un gigantisme cellulaire et un aspect fin « perlée », de la chromatine, témoignant d'un trouble de synthèse d'ADN et quelle que soit la cause, les mitoses sont altérées et retardées. Ces anémies macrocytaires et/ou mégablastiques, sont très souvent dues à une carence en cobalamine (Vit. B12) ou en folates. Ces deux vitamines hydrosolubles interviennent comme coenzyme dans une

chaîne de réactions indispensables à la synthèse de l'ADN [8]. La réaction essentielle (Fig. 1) fait intervenir un métabolite du dérivé réduit (tétrahydrofolate, FH<sub>4</sub>) de l'acide folique, le N<sub>5</sub>N<sub>10</sub>-méthylène FH<sub>4</sub>:

il intervient comme coenzyme de la réaction transformant les déoxyuridyates en thymidylates. Son absence empêche ainsi la production de l'une des bases de l'ADN, précisément celle qui différencie la molécule d'ADN de celle d'ARN dont la fonction n'est pas perturbée: la synthèse protéique reste intacte. Il est probable que la mégalo blastose provienne d'un défaut de la synthèse du tymidylate [9]. On comprend notamment que la synthèse protéique de l'hémoglobine ne soit pas altérée dans les anémies mégalo blastiques.



**Figure 1:** Rôle biologique des folates.

Une macrocytose apparaît quand un déséquilibre existe entre une synthèse de l'hémoglobine normale et un processus mitotique déficient [8].

L'identification de l'anémie mégalo blastique se fait par l'hémogramme, le taux de réticulocytes et le myélogramme, on effectue également des dosages de fer, de la bilirubine et de LDH. L'anémie mégalo blastique se manifeste lorsque les cellules érythroïdes mégalo blastiques entrent dans la phase S (synthèse d'ADN) et elles s'arrêtent soit à la fin de la phase S soit à la fin de la phase S-G2 [5,7].

Le but de ce travail est d'évaluer certains paramètres hématologiques chez des patientes, qu'on soupçonne, d'être atteintes d'une anémie macrocytaire d'étiologie indéterminée ou en cas d'anémie mégalo blastique; particulièrement, en ciblant des sujets hospitalisés et qui sont donc susceptibles d'avoir une carence vitaminique. La mise au point de la technique de dosage des folates cherche à mettre en évidence une carence dont les signes d'appel cliniques sont le plus souvent frustes au début de l'affection.

**MATERIEL ET METHODES**

**Prélèvements**

Notre étude a porté sur 10 patientes adultes, recrutées en mai 2001 dans le service d'hématologie du CHU de Sétif. Les prélèvements ont été réalisés le matin à jeun sur tube hépariné. Après centrifugation (3000 rpm, pendant 5 min),

le plasma est réparti dans des tubes secs. Les plasmas hémolysés ont été exclus de l'étude. Les plasmas obtenus ainsi que les hémolysats sont congelés rapidement à -20°C jusqu' à analyse (6 semaines au maximum).

**Méthodes utilisées**

Les paramètres hématologiques sont déterminés automatiquement à l'aide du Coulter-Counter. L'examen qualitatif des cellules sanguines sur frottis, est réalisé par la coloration de May Grünwald Giemsa (MGG). L'étude de la macrocytose est effectuée à partir de la ponction médullaire réalisée à l'aide d'un trocart de Mallarmé. Cette ponction permet d'obtenir le suc médullaire par aspiration et de réaliser un frottis. Les frottis de moelle sont colorés par le May Grünwald Giemsa, les modalités de coloration sont identiques à celles de la coloration du frottis sanguin.

Le dosage des folates est effectué par la méthode microbiologique en utilisant le germe folico-dépendant le *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Le sérum est déprotéinisé et le surnageant incubé à 37°C dans un milieu de culture adapté à la détermination des folates (Folic Acid Medium, DIFCO, 0822-15). La turbidité du milieu de culture est lue au spectrophotomètre à 650 nm. La durée minimale pour une détermination est de 3 jours. Cette méthode consiste à quantifier la croissance de micro-organismes auxotrophes, cette croissance est comparée à celle obtenues avec plusieurs concentrations d'une gamme étalon de folates [10]. Les dosages sont effectués avant toute prescription médicamenteuse ce qui rendrait le résultat ininterprétable.

A partir des données du registre des patients recrutés de 1984 à 2000 dans le service d'hématologie du CHU de Sétif, est estimée l'évolution chronologique dans le nombre de cas d'anémie mégalo blastique chez les hommes et les femmes.

**Analyse statistique**

Les valeurs numériques présentées dans le tableau 1 correspondent aux moyennes des résultats expérimentaux, affectées de leur écart-type, S. La comparaison entre le nombre de cas atteint d'anémie mégalo blastique chez les hommes et les femmes, est analysée par le Chi<sup>2</sup>. Les différences sont significatives lorsque p < 0.001.

**RESULTATS ET DISCUSSION**

Quatre patientes ont été exclues selon les critères d'exclusions biologiques: six patientes présentent une

Paramètres	Hb (g/dl)	RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	WBC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Hct (%)	MCV (fL)	folate sérique (ng/ml)	folate érythrocytaire (ng/ml)
Patientes	9.08±1.68 (6.5-12.9)	2.72±0.72 (1.66±4.24)	2.93±0.61 (1.5 - 3.7)	26.58±5.09 (18.5-37.6)	99.57±11.59 (84.9±112.5)	10.01±2.5 (8.07 - 12.48)	298±44.79 (242.8-384.8)
Normal	11.5-16	4.2 -5.4	4 - 10	37-47	77 - 93	3.3 - 16.9	> 140

**Tableau 1:** Paramètres hématologiques chez une population féminine soupçonnée d'être atteintes d'anémie macrocytaire (entre parenthèses, valeurs du maximum et du minimum).

B12. L'observation d'une macrocytose et/ou d'une mégaloblastose oriente donc le diagnostic et conduit à effectuer des dosages sanguins. La macrocytose avec ou sans anémie est aisément reconnue grâce aux compteurs automatiques de globules qui mesurent le volume globulaire moyen (VGM). L'anémie mégaloblastique se manifeste lors d'une carence vitaminique en vitamine B12 et ou en folates, dont le diagnostic est basé sur l'hémogramme (FNS); montrant clairement une diminution des paramètres hématologiques (les hématies, l'hémoglobine, les leucocytes, l'hématocrite,...) [5,11]. Les résultats obtenus à partir de 6 patientes montrent clairement une diminution dans ces paramètres hématologiques, à l'exception du VGM qui reste sensiblement élevé (au dessus de 95 fL), ce qui définit une anémie macrocytaire [12] (Tab. 1).

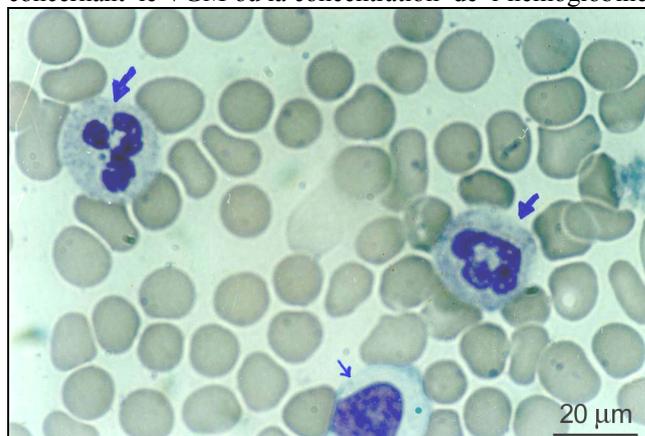
Tous les changements enregistrés au niveau des paramètres hématologiques, indiquent la présence d'une anémie macrocytaire, montrant la macrocytose, l'anisocytose, la poïkylocytose et la polysegmentation des neutrophiles (à plus de 5 lobes) [13] et avec un cytoplasme basophile (Fig. 2). Le myélogramme, effectué devant toute anémie macrocytaire, montre une grande dystrophie des érythroblastes avec une mégaloblastose médullaire, reflet du trouble de division (Fig. 3). Cette mégaloblastose est caractérisée par un retard de maturation nucléaire avec chromatine fine (perlée) et un cytoplasme de maturation normale, les cellules sont riches en ARN et le rapport ADN/ARN est inférieur à celui des cellules normales et le cytoplasme est fortement basophile [7,8,14,15]. Les anomalies cytologiques témoignent d'une anomalie de biosynthèse de l'ADN puisque les deux vitamines du groupe B (vitamine B12 et folate) sont des coenzymes impliquées dans cette biosynthèse.

En inhibant la biosynthèse du tymidylate donc de l'ADN, une carence en folates est responsable de l'anémie et des anomalies morphologiques observées au cours des carences vitaminiques notamment macrocytose sanguine et mégaloblastose médullaire [16].

L'anémie mégaloblastique peut être provoquée par déficit en acide ptéroylglutamique (acide folique) [8,17], par déficit ou inhibition de la dihydrofolate réductase nécessaire à la production de FH<sub>4</sub> et par déficit en vitamine B12, qui bloque la production de FH<sub>4</sub>, hypothèse la plus probable du rôle de la vitamine B12 [8,18]. Les types d'affections gastriques peuvent également être responsables d'anémie mégaloblastique par carence en vitamine B12 [19].

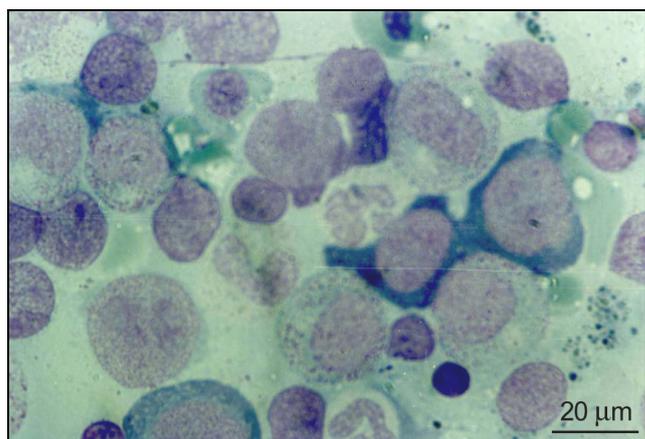
En cas de déficit en vitamine B12, son taux sérique est diminué, mais du fait de l'interconnexion de son métabolisme avec celui des folates, les folates érythrocytaires sont abaissés même si les folates sériques sont normaux, voire élevés. Les folates érythrocytaires donnent cependant une meilleure estimation des réserves

réelles de l'organisme en raison des fluctuations rapides des folates sériques. Jaffe et Schilling ont montré, qu'en comparant un groupe montrant une diminution dans le taux des folates érythrocytaires avec un autre groupe normal, qu'aucune différence n'a été trouvée entre ces deux groupes, concernant le VGM ou la concentration de l'hémoglobine



**Figure 2:** Frottis sanguin d'une patiente atteinte d'anémie macrocytaire.

Coloration de May Grunwald-Giemsa. Noter l'anisocytose, la macrocytose et un lymphocyte avec un noyau arrondi et volumineux (flèche fine), ainsi que la présence de polynucléaires hypersegmentés (flèche épaisse).



**Figure 3:** Lame de moelle d'une patiente atteinte d'anémie macrocytaire. Mégaloblastes à différents stades de maturation.

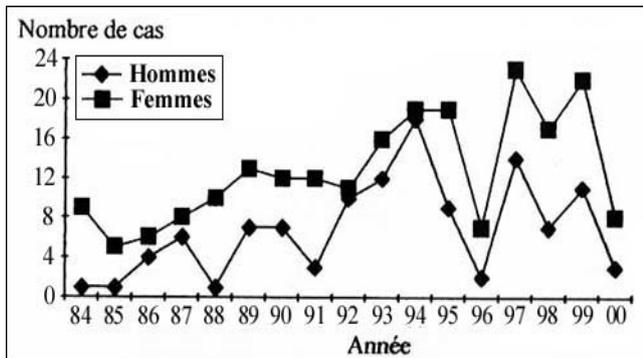
[20]. Il a été montré que la diminution dans le taux des folates érythrocytaires est plus corrélée que la diminution dans le taux des folates sériques avec le degré de changement de l'anémie mégaloblastique au niveau de la moelle osseuse. En revanche, cette corrélation n'est pas claire lorsqu'il s'agit du cas où le taux de la vitamine B12 est normal [20]. Par contre, chez les patients alcooliques montrant une mégaloblastose, les taux en folates sériques et érythrocytaires et en B12 sériques sont normaux [17]. Rain a montré que toutes les anémies macrocytaires ne sont pas dues à une carence vitaminique et peuvent relever d'une anomalie de la synthèse d'ADN congénitale ou acquise, toxique ou néoplasgique [22]. La macrocytose avec mégaloblastose médullaire peut s'observer sans anémie [23] et la précède en tout cas [24]. Plus la macrocytose est

importante plus la probabilité d'une anémie mégalo-blastique est grande [25].

Nous décrivons dans notre étude 6 cas de femmes, chez lesquelles un déficit en folate ne semble pas impliqué, mais qui présentent des valeurs de VGM peu élevées. Selon cette controverse et apparemment dans cette présente étude, la présence de l'anémie macrocytaire chez quelques patientes et l'absence de carence en acide folique suggère une hétérogénéité dans les résultats, dont la pathologie moléculaire reste à élucider sur la nature de cette maladie. Plusieurs techniques permettent la détermination des folates dans le sérum. Leur sensibilité sont variables. Les méthodes microbiologiques constituent la méthode de référence. Ces méthodes ne sont cependant pas idéales et peuvent conduire à des résultats erronés [26]. Il convient donc de toujours confronter les résultats aux symptômes cliniques.

L'évolution chronologique de l'anémie mégalo-blastique dans la région de Sétif touchant la période de 1984 à 2000 (Fig. 4), a montré que cette maladie est plus fréquente chez les femmes que les hommes et la différence est hautement significative ( $p < 0.001$ ) et est estimée en moyenne et par an à  $12.76 \pm 5.82$  et  $6.82 \pm 4.99$  respectivement, ceci peut être expliqué par l'augmentation des besoins pendant la grossesse et l'allaitement [8]. Comme il est admis de considérer que l'anémie de Biermer (anémie perniciose) est la plus fréquente de toutes les causes de carence en B12 [19]; comme faisant partie des maladies auto-immunes, ce dont plaident la fréquence chez la femme (thyroïdite, maladie de Basedow, anémie hémolytique, lupus) [8].

Enfin, on remarque également un certain parallélisme dans l'évolution du nombre de cas de cette maladie entre les hommes et les femmes de 1996 à 2000, dont les causes restent inconnues (Fig. 4).



**Figure 4:** Evolution chronologique dans le nombre de cas d'anémie mégalo-blastique dans la région de Sétif entre 1984 et 2000.

## CONCLUSION

Le dosage de la vitamine B12 et des folates, permet de rattacher les anomalies hématologiques à un déficit vitaminique. Les tests biologiques proposés dans ce travail, aideront à mieux définir l'étiologie de la malabsorption de la cobalamine et des folates, de doser la vitamine B12 et les folates et de définir les traitements pour certaines maladies du sang. Enfin, la sensibilité et la spécificité dans la diminution du taux des folates dans le diagnostic des individus sains ou malades sont non élucidées. Seuls les

paramètres biochimiques et histologiques des folates tissulaires sont complémentaires et l'interprétation des diminutions dans les taux des folates reste une problématique. Il convient donc, de toujours confronter les résultats obtenus aux symptômes cliniques.

## REFERENCES

- [1]- Potier de Courcy G. et Zittoun J., "Acide folique", *In*: Références en biologie clinique (Siest G, Henny J, Schiele F, eds). Elsevier, Paris, (1990).
- [2]- Zittoun J. et Copper B.A., "Folates et cobalamines". Doin, Paris, (1987).
- [3]- Klee G. G., "Cobalamin and folate evaluation: Measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B12 and folate", *Clin. Chem.*, **46**, (2000), pp.277-1283.
- [4]- Colon-Otero G., Menke D. and Hook C.C., "A practical approach to the differential diagnostic and evaluation of the adult patient with macrocytic anemia", *Med. Clin. North Am.*, **76**, (1992), pp.581-597.
- [5]- Wajecman H., Lantz B. et Girot R., "Les maladies du globule rouge", Editions: INSERM/ Médecine-Sciences Flammarion, Paris, (1992).
- [6]- Snower D. P. and Weil S. C., "Changing etiology of macrocytosis: Zidovudine as a frequent causative factor", *Am. J. Clin. Pathol.*, **99**, (1993), pp.57-60.
- [7]- Longprès B., "Les anémies", 2<sup>ème</sup> Edition: Masson, Paris, (1994).
- [8]- Casassus P., "Anémies macrocytaires de l'adulte. Physiopathologie, étiologie, diagnostic, traitement", *Rev. Prat.*, **45**, (1995), pp.101-106.
- [9]- Chanarin I., "Interrelations entre cobalamines et folates", *In*: Folates et cobalamines (Zittoun J. et Copper BA., eds) Doin, Paris, (1987).
- [10]- Sultan Y., Bernard J., Levy J. P., Varet B., Clauvel J. P. et Rain J. D. "Hématologie", 7<sup>ème</sup> Edition: Masson, Paris, (1990).
- [11]- Savage D. G., Ogundipe A., Allen R. H., Stabler S. P. and Lindenbaum J., "Etiology and diagnostic evaluation of macrocytosis", *Am. J. Med. Sci.*, **6**, (2000), pp.343-352.
- [12]- Dawson D.W. and Waters H.M. "Malnutrition: folate and cobalamin deficiency", *Br. J. Biomed. Sci.*, **51**, (1994), pp.221-227.
- [13]- Herbert V., "Megaloblastic anemias", *Lab. Invest.*, **52**, (1985), pp.3-18.
- [14]- Glusker J. P. "Vitamin B12 and The B12 Coenzymes", *Vitamins and Hormones*, **50**, (1995), pp.1-76.
- [15]- Wollman M. R., Penchansky L. and Shekhter-Levin S., "Transient 7q- in association with megaloblastic anemia due to dietary folate and vitamin B12 deficiency", *J. Pediatr Hematol. Oncol.*, **18**, (1996), pp.162-165.
- [16]- Zittoun J., "Cobalamines: actualisation des données métaboliques cliniques, diagnostiques et thérapeutiques", *Hématologie*, **2**, (1996), pp.119-129.
- [17]- Donnelly J.G., "Folic acid", *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **38**, (2001), pp.183-223.
- [18]- Carretti N., Eremita G.A., Porcelli B., Paternoster D. and Grella P., "Pattern of vitamin B12 and folic acid during pregnancy", *Gynecol. Obstet. Invest.*, **38**, (1994), pp.78-81.
- [19]- Zittoun J., "Biermer's disease", *Rev. Prat.*, **15**, (2001), pp.1542-1546.
- [20]- Jaffe J.P. and Schilling R.F., "Erythrocyte folate levels: A clinical study", *Am. J. Hematol.*, **36**, (1991), pp.116-121.
- [21]- Savage D. and Lindenbaum J., "Anemia in alcoholics", *Medicine*, **65**, (1986), pp.322-338.

- [22]- Rain J.D., "Intérêt en hématologie du dosage des cobalamines et des folates", *Immunoanal. Biolo. Spéc.*, **32**, (1992), pp.17-24.
- [23]- Croft R.F., Streeler A.M and O'Neill B.J., "Red cell indices in megaloblastosis and iron deficiency", *Pathology*, **6**, (1974), pp.107-117.
- [24]- Herbert V., "Experimental nutritional folate deficiency in man", *Trans. Assoc. Am.Phys.*, **75**, (1962), pp.307-320.
- [25]- Mc Phedran P., Barnes M.G, Weinstein J.S. and Robertson J.S., "Interpretation of electronically determined macrocytosis", *Ann. Intern. Med.*, **78**, (1973), pp.677-683.
- [26]- Arnaud J., Cotisson A., Meffre G., Bourgeay-Causse M., Augert C., Favier A., Comet M. et Ville G., "Comparaison de différentes méthodes de dosage des folates sériques", *Ann. Biol. Clin.*, **50**, (1992), pp.25-30. □