

# Arbre décisionnel « Hémolyse ou anémie »

Phénotype clinique  
Bilan biologique de base

Anémie sévère  
transfusion-dépendante

Phénotype non  
interprétable

Tests de niveau 1 appropriés

Orientation  
diagnostique claire

Pas d'orientation  
diagnostique claire

Si nécessaire

Tests niveau 2

NGS GR panel élargi

Négatif

Non conclusif

Séquençage de génome

Si nécessaire

Variant  
classe 3

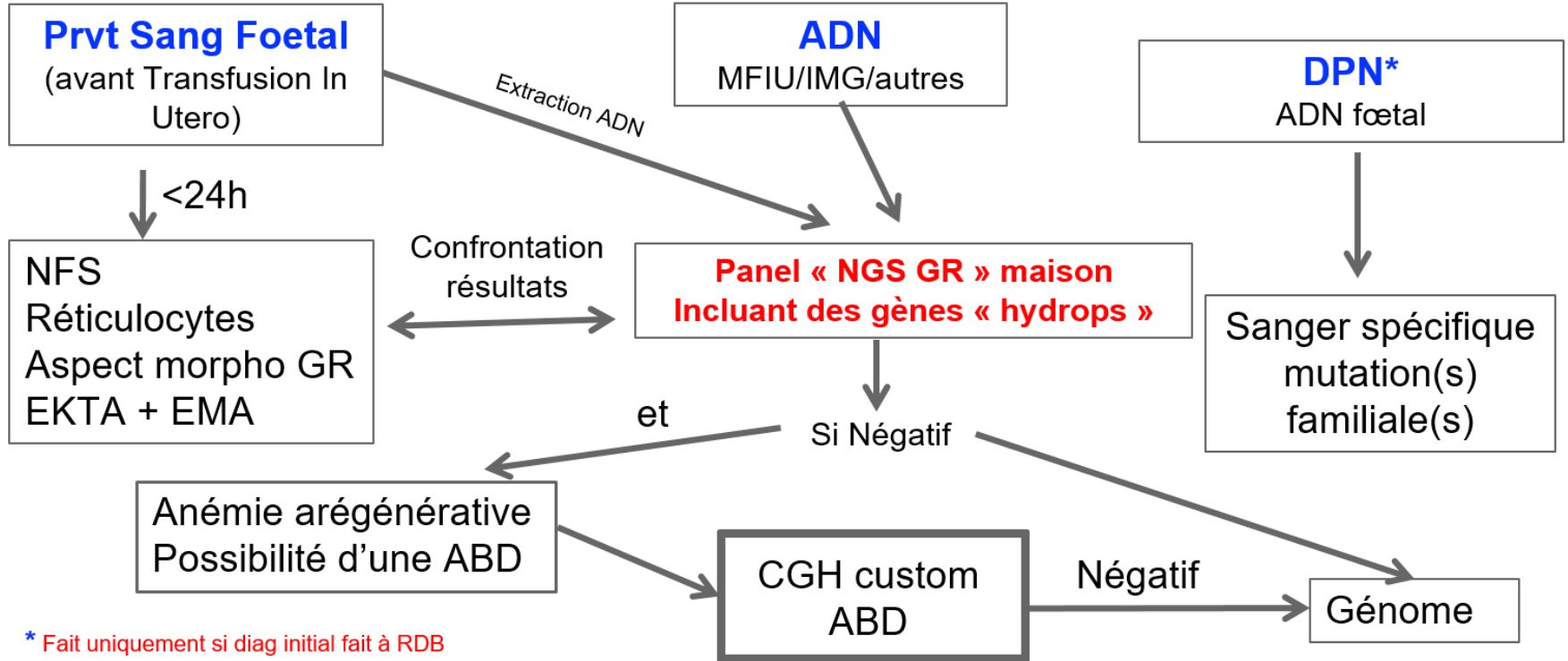
Négatif

Tests niveau 3 (RIHN) ou 4 (Recherche)

Impasse  
diagnostique

# CAS PARTICULIERS DES PRELEVEMENTS FOETAUX

**Hydrops fœtalis – Contexte anémie fœtale inexpliquée**  
**Après élimination des causes les plus fréquentes**



\* Fait uniquement si diag initial fait à RDB

# Bilan biologique de base (avant toute transfusion)

- Hémogramme (indices érythrocytaires +++)
- Numération des réticulocytes et répartition (si disponible)
- Morphologie des GR sur frottis sanguin (cytologiste spécialisé)
  
- Bilan d'hémolyse: bilirubine totale et libre, LDH, haptoglobine (âge > 1 an, avec dosage orosomucoïde ou CRP en parallèle)
- Bilan fer complet : fer, ferritine, coefficient saturation transferrine
- Dosage vitamine B12 et folates
  
- Test direct à l'antiglobuline (Coombs direct)
- Recherche d'un clone HPN
- Autre selon contexte (infectieux, toxique, etc.)



**Permet 1<sup>re</sup> orientation diagnostique**



**Elimination d'une éventuelle cause acquise (si contexte hémolytique)**

+/- étude des parents / collatéraux si disponibles

# HEMOGLOBINOPATHIES

## Tests niveau 1

- Etude phénotypique des fractions d'hémoglobine (2 techniques minimum)
- Troisième technique indispensable si variant objectivé ou contexte clinique évocateur : test de falciformation d'Emmel pour HbS (ou autre test cytologique), test immunologique rapide type Sickle scan (HbS, HbC), électrophorèse en citrate agar (pH acide), test de solubilité d'Itano pour HbS, CLHP en phase inverse des chaînes de globine, focalisation isoélectrique, etc.
- Si suspicion Hb instable : recherche de corps de Heinz ou d'inclusions d'HbH ou Bart's, courbe de densité érythrocytaire par la méthode des phtalates (**attention, test d'orientation : valeur diagnostique non évaluée**)

## Tests niveau 2a tests génétiques de 1<sup>re</sup> intention

- Séquençage alpha et bêta-globine
- Délétions alpha-thalassémiques communes (gap-PCR)

## Tests niveau 2b tests génétiques de 2<sup>e</sup> intention

- MLPA alpha et bêta +/- gap-PCR dédiées
- Séquençage gamma-globine

## Tests niveau 3

- Dosage / génotypage Cytb5 réductase (en cas de méthémoglobinémie importante)
- Détermination p50 sur Hemox-Analyzer (si suspicion variant hyper ou hypo-affin pour l'oxygène)
- Test à l'isopropanol (si suspicion Hb instable)

## Tests niveau 4

- i. Rapport de synthèse alpha/bêta-globine (non réalisé en France)
- ii. Etude de la filtration splénique : taux d'érythrocytes vacuolés (ou pocked cells)
- iii. Dosage par spectrophotométrie des marqueurs directs d'hémolyse dans le plasma : hème, hémoglobine et hémopexine

# MEMBRANOPATHIES

## Tests niveau 1

- Test à l'EMA (**indispensable**)
- Tests basés sur la résistance osmotique : dont Pink-test, etc.
- Courbe de densité érythrocytaire par la méthode des phtalates (**attention, test d'orientation : valeur diagnostique non évaluée**)

## Test niveau 2

- Ektacytométrie (idéalement couplée à l'EMA)

## Test niveau 3a

- NGS « Membranopathie »

## Test niveau 3b

- Electrophorèse des protéines de membrane érythrocytaire

## Tests niveau 4

- Potentiel de membrane (pour variants *PIEZO1*) : S. Egée, CNRS Roscoff
- Dosage par spectrophotométrie des marqueurs directs d'hémolyse dans le plasma: hème, hémoglobine et hémopexine
- Analyse des flux cationiques (pour variants *PIEZO1*) : H. Guizouarn, Nice
- Microsphiltration (étude de la filtrabilité des GR dans un système splenomimétique)
- Stopped-flow (mesure cinétique transport ionique)
- Western-blot des protéines de membrane

# ENZYMOPATHIES

## Tests niveau 1

- Mesure des activités G6PD/PK : idéalement avec normalisation hexokinase, sinon rapport G6PD/PK
- Recherche de corps de Heinz

## Tests niveau 2a

- Séquençage ciblé G6PD/PK
- Co-oxymétrie ou spectrophotométrie : MetHb

## Tests niveau 2b

- NGS « Enzymopathie GR »
- Mesure d'activités d'enzymes rarement déficitaires en cas de clinique très évocatrice (ex. : déficit en Triose Phosphate Isomérase)

## Tests niveau 3

- Mesures d'activités enzymatiques « rares » (TPI, GPI, P5N, PGK) : **si et seulement si anomalie sur l'étude génétique**
- Détection hétérozygotes G6PD par CMF (cytométrie en flux)

## Tests niveau 4

- Etude fonctionnelle enzymatique (Km) si variant classe 3 ou discordance phénotype/génotype
  - Dosage par spectrophotométrie des marqueurs directs d'hémolyse dans le plasma : hème, hémoglobine et hémopexine
  - Dosage antigène PK
  - Dosage ATP
- } Non réalisés en France – Professeur Richard van Wijk (Utrecht) : R.vanWijk@umcutrecht.nl

# DYSERYTHROPOIESES CONGENITALES

## Tests niveau 1

- Myélogramme : **indispensable (cytologiste expert)**
- Dosage des récepteurs solubles de la transferrine
- Etude des fractions de l'hémoglobine (HbF)

## Tests niveau 2

- NGS « Anémies dysérythropoïétiques congénitales »
- Electrophorèse des protéines de membrane (intérêt pour CDA2)

## Tests niveau 4

- i. Dosage GDF11, GDF15
- ii. Microscopie électronique
- iii. Aquaporine
- iv. InLu phenotype (CNR GS)
- v. Expression CD44 (cytométrie flux)
- vi. Chaînes de globine embryonnaires (epsilon, zêta)

# ANEMIES SIDEROBLASTIQUES CONSTITUTIONNELLES

## Examen clinique :

- Diagnostic différentiel « forme isolée » *versus* « forme syndromique »
- Eliminer une intoxication au plomb

## Tests niveau 1

- Myélogramme avec coloration Perls (cytologiste expert)
- Dosage des récepteurs solubles de la transferrine
- IRM hépatique avec détermination de la concentration hépatique en fer (CHF)

## Tests niveau 2

- NGS « Anémies sidéroblastiques constitutionnelles » : panel formes non syndromiques
- NGS « Anémies sidéroblastiques constitutionnelles » : panel formes syndromiques

## Test niveau 3

- NGS « Pathologie mitochondriale » dans les formes syndromiques, en fonction des signes cliniques associés



Cf. labos filière FILNEMUS



# ANEMIES microcytaires « NON SIDEROBLASTIQUES »

## Tests niveau 1

- Bilan d'hémolyse
  - Etude des fractions de l'hémoglobine et recherche de corps de Heinz
  - Dosage des récepteurs solubles de la transferrine
  - Dosage transferrine, céruloplasmine
  - IRM hépatique avec détermination de la concentration hépatique en fer (CHF)
- } Elimination hémoglobinoïde H ou forme rare de thalassémie

## Test niveau 2a

- NGS « Anémies constitutionnelles rares liées à une anomalie du métabolisme du fer » (*TMPRSS6*, *DMT1* (*SLC11A2*), *CP*, *STEAP3*...)

## Test niveau 2b

- Dosage d'hepcidine plasmatique

Arbre  
décisionnel  
« Polyglobulie »

**Suspicion Polyglobulie (PG) vraie (OMS 2016)**

ATCD personnels et familiaux, thrombose, tabac, apnée du sommeil,  
traitement (androgènes, diurétiques)  
signes fonctionnels : prurit aquagénique → PV

**Diagnostic OK**

**Tests niveau 1 puis 2**

**Pas d'orientation étiologique claire**

Mesure VGT obligatoire

VGT > 125%

VGT < 125%

**Tests niveau 3a**

Si négatif

**NGS « Polyglobulie »**

Si échec

**Séquençage de génome**

Diag fait ou variant classe 3

Négatif

**Tests niveau 4 (Recherche)**

**PG idiopathique**

# SUSPICION POLYGLOBULIE VRAIE

## Tests niveau 1

- Mutations *JAK2* V617F et exon 12 (polyglobulie de Vaquez ou PV)
- Dosage EPO plasmatique (si ↘ : PV ou mutation récepteur EPO ; si ↗ : cause secondaire)
- Ionogramme (hémococoncentration)

puis selon contexte:

- Bilan phénotypique de l'hémoglobine (3 techniques) + p50 calculée (GDS veineux) ou mesurée (Hemox-Analyzer)
- GDS artériels ou capillaires (élimination hypoxies, HbCo et MetHb élevées)
- Echographie abdomino-pelvienne (splénomégalie ? Tumeur ? foie, reins, utérus, ovaires)
- Bilan martial et hémolytique si CCMH élevée (ektacytométrie pour éliminer stomatocytose déshydratée à *PIEZO1*)

## Test niveau 2

- Séquençage des gènes *HBB*, *HBA1/A2* et *BPGM*

## Tests niveau 3a

- Pousse spontanée des progéniteurs érythroïdes (PV *JAK2* négative)
- Dosage du 2,3-DPG
- Biopsie osseuse
- EFR (pathologie respiratoire), polysomnographie nocturne (syndrome d'apnée du sommeil)

## Test niveau 3b

- NGS « Polyglobulie » après confirmation de l'augmentation du VGT (méthode radio-isotopique au <sup>99</sup>Tc ou par CO rebreathing)

## Tests niveau 4

- i. Mesure viscosité sanguine
- ii. Tests fonctionnels des variants de signification indéterminée
- iii. Etudes d'expression