

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**

 Référence : **ANPGM\_137**  
 Page 1/31

 Numéro de version : **1**

Pour les versions révisées :

- Date de 1<sup>ère</sup> mise en application :
- Numéro de l'ancienne version du document : ANPGM\_
- Date de révision :

Nom	Hôpital	Date
<b>Rédacteur(s) et vérificateurs</b>	<b>Groupe Diagnostic de la filière MCGRE</b>	14/03/2019
	Dr Ketty Lee - CHU Pointe-à-Pitre  Dr Patrice Maboudou - CHU Lille  Pr Loïc Garçon - CHU Amiens Dr Estelle Cadet - CHU Amiens  Dr Agnès Lahary - CHU Rouen  Pr Lydie Da Costa - CHU Robert-Debré Dr Nathalie Couque - CHU Robert-Debré  Dr. Serge Pissard - CHU Henri-Mondor Dr. Lamisse Mansour-Hendili - CHU Henri-Mondor Dr. Stéphane Moutereau - CHU Henri-Mondor  Dr. Véronique Picard - CHU Kremlin-Bicêtre  Pr François Girodon - CHU Dijon  Dr Philippe Joly - CHU Lyon Dr Céline Renoux - CHU Lyon  Pr Patricia Aguilar-Martinez - CHU Montpellier Dr Muriel Giansily-Blaizot - CHU Montpellier  Pr Catherine Badens - CHU Marseille Dr Nathalie Bonello-Palot - CHU Marseille	
<b>Approbateur(s)</b>	<b><u>Pour le CA de l'ANPGM :</u></b>  Benoit ARVEILER Cécile ACQUAVIVA Anne-Francoise ROUX Pascale SAUGIER-VEBER	02/05/2019
	CHU Bordeaux CHU Lyon CHU Montpellier CHU Rouen	

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**

 Référence : **ANPGM\_137**  
 Page 2/31

 Numéro de version : **1**

## Table des matières

1. Introduction.....	4
2. Hémoglobinopathies.....	5
2.1 Pathologie moléculaire – Corrélations Phénotype-Génotype .....	5
2.1.1 Introduction.....	5
2.1.2 Hémoglobinopathies liées au cluster alpha globine.....	6
2.1.2 Hémoglobinopathies liées au cluster bêta globine.....	6
2.1.4 Hémoglobinopathies liées aux gènes gamma globine – PHHF.....	7
2.2 Diagnostic moléculaire.....	7
2.2.1 Techniques disponibles .....	7
2.2.1.1 Cas index.....	7
2.2.1.2 Cas apparenté .....	8
2.2.2 Cas index - Principales situations cliniques .....	8
2.2.2.1 Syndrome drépanocytaire majeur.....	8
2.2.2.2 Bêta-thalassémie majeure ou intermédiaire.....	9
2.2.2.3 Trait bêta-thalassémique .....	9
2.2.2.4 Alpha-thalassémie .....	10
2.2.2.5 Variant de l'hémoglobine .....	10
2.2.2.5 Variant delta ou delta-thalassémie.....	11
2.2.2.6 Augmentation du taux d'HbF (âge > 5 ans).....	11
2.2.3. Conjoint d'un patient porteur hétérozygote d'une hémoglobinopathie et diagnostic pré-nataux (DPN).....	12
2.2.4 Rendu du résultat et cotation .....	13
2.2.4.1 Cas index et apparenté .....	13
2.2.4.2 Diagnostic pré-natal (DPN) .....	13
3. Enzymopathies fréquentes du globule rouge .....	13
3.1 Pathologie moléculaire – Corrélation phénotype-génotype .....	13
3.1.1 Introduction.....	13
3.1.2 Déficit en G6PD.....	14
3.1.3 Déficit en PK .....	14
3.2 Diagnostic moléculaire.....	15
3.2.1 Techniques disponibles .....	15
3.2.2 Indications du diagnostic moléculaire.....	15
3.2.2.1 Cas index ou apparenté.....	15

<b>DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE</b>
--

Référence : <b>ANPGM_137</b>	Numéro de version : <b>1</b>
Page 3/31	

3.2.2.2 Dépistage pré-natal (DPN).....	16
3.2.3 Cotation .....	16
3.2.3.1 Cas index et apparenté .....	16
3.2.3.1 DPN .....	16
4. Autres pathologies rares du globule rouge.....	16
4.1 Pathologie moléculaire – Corrélation phénotype-génotype .....	16
4.1.1 Membranopathies érythrocytaires constitutionnelles.....	16
4.1.1.1 Introduction.....	16
4.1.1.2 Sphérocytose héréditaire (Maladie de Minkowski Chauffard).....	16
4.1.1.3 Elliptocytose et pyropoïkilocytose héréditaires - ovalocytose mélanésienne .....	17
4.1.1.4 Stomatocytoses héréditaires.....	17
4.1.2 Enzymopathies rares du globule rouge .....	18
4.1.3. Les polyglobulies (érythrocytoses) constitutionnelles .....	19
4.1.4 Les anémies dysérythropoïétiques congénitales (CDA) .....	19
4.1.5 Les anémies sidéroblastiques constitutionnelles.....	20
4.1.6 Le syndrome IRIDA.....	21
4.2 Diagnostic moléculaire.....	22
Annexe 1 : Hémoglobinopathies (Codes Orphanet).....	23
Annexe 2 : Pathologies constitutionnelles de la Membrane du GR - Gènes et codes Orphanet ....	24
Annexe 3 : Enzymopathies rares du GR - Gènes et codes Orphanet .....	25
Annexe 4 : Gènes associés aux dysérythropoïèses congénitales (CDA).....	26
Annexe 5 : Gènes associés aux anémies sidéroblastiques constitutionnelles .....	27
Références bibliographiques .....	28
Groupe Diagnostic de la filière MCGRE.....	30

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**Référence : **ANPGM\_137**  
Page 4/31Numéro de version : **1**

## 1. Introduction

La filière maladies rares MCGRE (Maladies Constitutionnelles du Globule Rouge et de l'érythropoïèse) prend en charge les maladies constitutionnelles suivantes:

- **les hémoglobinopathies**, principalement la drépanocytose et les thalassémies alpha et bêta ;
- **les pathologies constitutionnelles de la membranes du globule rouge** : sphérocytose, elliptocytose, ovalocytose et stomatocytose héréditaires;
- **les déficits enzymatiques du globule rouge**, principalement les déficits en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et en pyruvate kinase (PK) ;
- **les polyglobulies héréditaires**, qui regroupent les variants de l'hémoglobine hyper-affins pour l'oxygène, les anomalies de la DPG-mutase et les polyglobulies constitutionnelles primitives;
- **les anémies dysérythropoïétiques congénitales** ou CDA;
- **les anémies sidéroblastiques constitutionnelles**;
- **les anémies par carence martiale d'origine constitutionnelle** (Syndrome IRIDA pour Iron Refractory Iron Deficiency Anemia).

D'un point de vue biologique, 5 grandes « portes d'entrée » peuvent être distinguées. Elles correspondent aux motifs de consultation initiaux de la majorité des patients atteints par une ou plusieurs de ces pathologies : **(i) microcytose/hypochromie avec ou sans anémie, (ii) macrocytose avec ou sans anémie, (iii) polyglobulie, (iv) hémolyse avec ou sans anémie, et (v) surcharge en fer.**

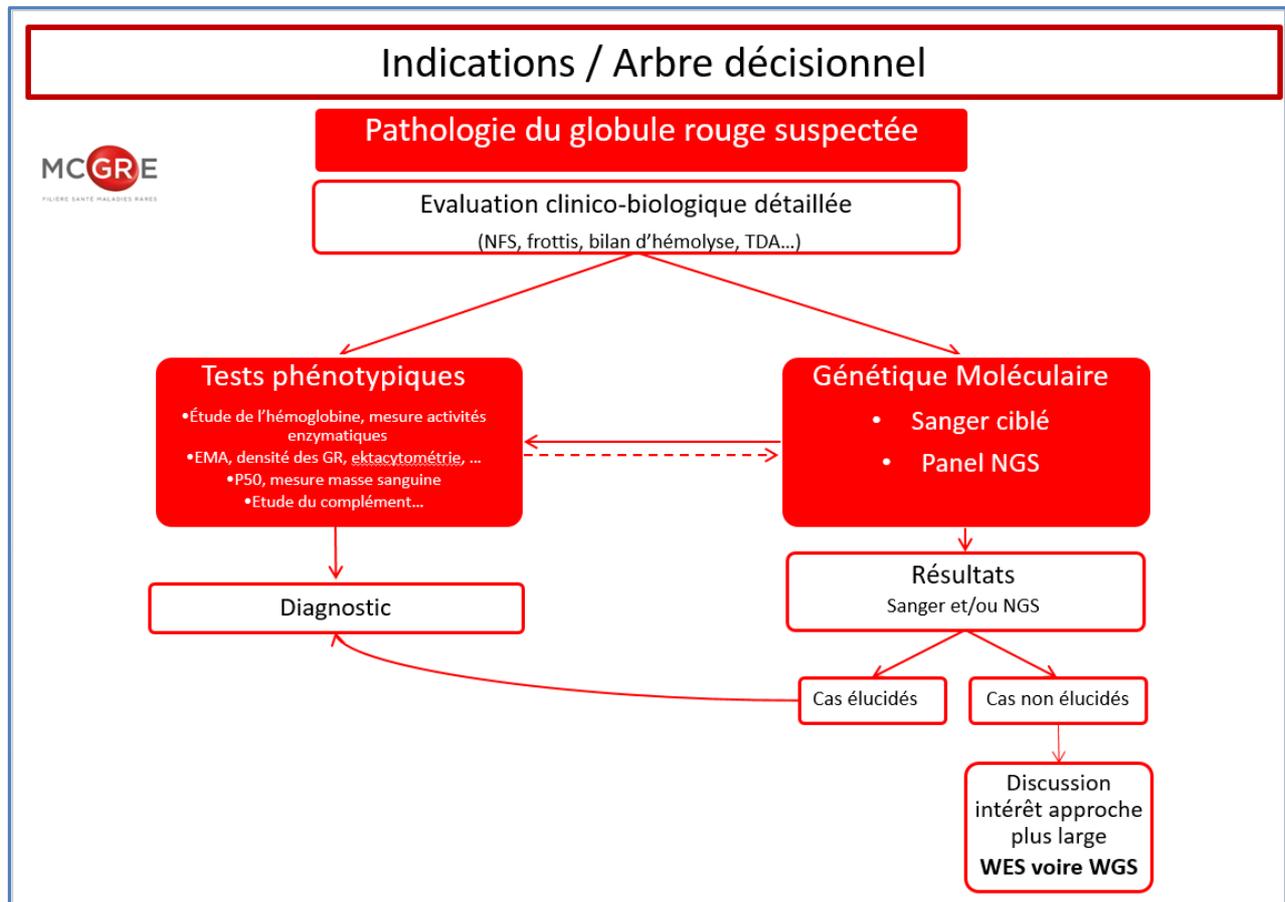
Ces profils biologiques pouvant être liés à de nombreuses causes, un interrogatoire approfondi du patient et des examens clinico-biologiques préalables sont indispensables afin d'éliminer les causes secondaires (ou acquises) avant de prescrire des analyses génétiques spécialisées. Des arbres décisionnels ont été établis par les membres du réseau « globule rouge » pour chacune de ces 5 grandes indications cliniques. Ils sont accessibles sur le site Internet de la filière MCGRE à l'adresse suivante : <http://filiere-mcgre.fr/>.

Des tests phénotypiques appropriés devront être réalisés préalablement à toute analyse génétique afin de cibler le gène ou le groupe de gènes à étudier en 1<sup>ère</sup> intention. L'arbre décisionnel général correspondant est représenté ci-dessous.

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**

 Référence : **ANPGM\_137**  
 Page 5/31

Numéro de version : 1



**Figure 1 : Arbre décisionnel général pour le diagnostic d'une hémoglobinopathie.**  
 NFS : Numération Formule-Sanguine ; TDA : test direct à l'antiglobuline ; EMA : éosine-5'-maléimide ; NGS : next-generation sequencing ; WES : whole exome sequencing ; WGS : whole genome sequencing.

## 2. Hémoglobinopathies

### 2.1 Pathologie moléculaire – Corrélations Phénotype-Génotype

#### 2.1.1 Introduction

Avant d'effectuer une analyse génétique d'hémoglobinopathie, il est indispensable de réaliser une étude phénotypique de l'hémoglobine au moyen de 3 techniques minimum, dont au moins une technique d'électrophorèse (NABM 1120), selon les recommandations déjà publiées par les membres du réseau (1). L'orientation diagnostique doit idéalement aussi prendre en compte d'autres éléments phénotypiques, tels que l'hémogramme, la numération des réticulocytes, l'examen du frottis sanguin, ainsi qu'un bilan d'hémolyse et un bilan martial complets. L'analyse moléculaire peut alors être envisagée afin de confirmer le diagnostic, d'évaluer certains éléments pronostiques, et de permettre le conseil génétique. Les pathologies correspondantes répertoriées sur Orphanet sont listées en Annexe 1.

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**Référence : **ANPGM\_137**  
Page 6/31

Numéro de version : 1

### 2.1.2 Hémoglobinopathies liées au cluster alpha globine

Le cluster alpha-globine est localisé sur le bras court du chromosome 16 et comprend principalement les gènes alpha globine, *HBA1* et *HBA2*, qui résultent d'un évènement de duplication ancestral et qui présentent exactement la même séquence codante (3 exons, 142 acides-aminés). Les transcrits de référence pour ces deux gènes sont respectivement NM\_000558 et NM\_000517.

On distingue schématiquement 2 grandes catégories d'hémoglobinopathies alpha-globine (2) :

(a) **les hémoglobinopathies « quantitatives » ou alpha-thalassémies** sont caractérisées par une diminution de la synthèse des chaînes alpha globine. Elles s'accompagnent le plus souvent d'une microcytose ou d'une anémie microcytaire de sévérité variable ;

(b) **les hémoglobinopathies « qualitatives »** sont caractérisées par la synthèse d'un variant de l'hémoglobine comportant une chaîne alpha anormale (variant alpha globine), qui est la plupart du temps sans incidence clinique, mais qui se révèle parfois instable, hypo- ou hyper-affine pour l'oxygène, etc.

Ces pathologies se transmettent le plus souvent sur le mode autosomique récessif. Chaque individu possédant 4 gènes alpha globine (2 gènes *HBA1* et 2 gènes *HBA2*), le taux d'expression théorique d'un variant alpha de l'hémoglobine est de 20 à 30% de l'hémoglobine totale. La majorité des anomalies des gènes alpha-globine observées dans la population générale sont des alpha-thalassémies d'origine délétionnelle.

### 2.1.2 Hémoglobinopathies liées au cluster bêta globine

Le cluster bêta-globine est localisé sur le bras court du chromosome 11 et comprend les gènes *HBE*, *HBD*, *HBG1*, *HBG2* et *HBB*. Ce dernier code la chaîne bêta-globine, principale chaîne de type bêta après l'âge de six mois à un an. Il a une structure similaire à celle des gènes alpha-globine (3 exons, 147 acides-aminés) et son transcrit de référence est NM\_000518.

Comme pour les pathologies du cluster alpha globine, on distingue des hémoglobinopathies bêta « quantitatives » (bêta-thalassémies) avec un très large spectre clinique allant du trait  $\beta$ -thalassémique bénin aux  $\beta$ -thalassémies majeures transfusion-dépendantes, en passant par des formes de  $\beta$ -thalassémie intermédiaire (3). Quelques délétions  $\beta$ -thalassémiques plus ou moins larges ont été décrites, mais la grande majorité des anomalies des gènes  $\beta$ -globine sont causées par des mutations ponctuelles ou des délétions - insertions courtes d'une ou deux bases. Ces pathologies se transmettent le plus souvent sur le mode autosomique récessif, mais une transmission d'expression dominante peut se rencontrer pour certains variants  $\beta$  hyper-instables ou hyper-affins pour l'oxygène.

Parmi les variants bêta de l'hémoglobine ( $\beta$ -hémoglobinopathies « qualitatives »), le variant bêta S est le plus fréquent. Le principal syndrome drépanocytaire majeur (SDM) est la drépanocytose qui correspond au génotype  $\beta^S/\beta^S$ . Les génotypes  $\beta^S/\beta$ -thal,  $\beta^S/\beta^C$ ,  $\beta^S/\beta^E$ ,  $\beta^S/\beta^{O-Arab}$ ,  $\beta^S/\beta^{D-Punjab}$  et  $\beta^S/\beta^{Lepore}$  donnent un SDM de sévérité variable (4). Certains variants bêta de l'hémoglobine (HbE par exemple) ont une expression diminuée. On parle alors d'hémoglobinopathie thalassémique.

## DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE

Référence : ANPGM\_137  
Page 7/31

Numéro de version : 1

### 2.1.4 Hémoglobinopathies liées aux gènes gamma globine – PHHF

Les hémoglobinopathies gamma sont causées par des mutations ponctuelles sur les gènes *HBG1* et *HBG2* qui donnent naissance à des variants gamma dont certains ont une incidence clinique (cyanose, anémie hémolytique). Leur importance en pathologie est néanmoins limitée aux premiers mois de vie en raison de la commutation physiologique des chaînes gamma vers les chaînes bêta-globine (remplacement progressif de l'HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) par de l'HbA ( $\alpha_2\beta_2$ )). A l'instar des gènes  $\alpha$ -globine, les gènes *HBG1* et *HBG2* (qui comprennent 3 exons et 147 acides-aminés) résultent d'un évènement de conversion génique (5). Cependant, ils se différencient par le codon 136 : Alanine pour *HBG1* ( $^A\gamma$ ) et Glycine pour *HBG2* ( $^G\gamma$ ). Les transcrits de référence pour ces deux gènes sont respectivement NM\_000559 et NM\_000184.

A côté des variants gamma globine 'structuraux', on distingue des syndromes de persistance héréditaire d'hémoglobine fœtale (PHHF) d'origine délétionnelle ou mutationnelle. Les PHHF mutationnelles sont causées par des mutations ponctuelles au niveau des promoteurs des gènes gamma globine qui ont pour effet d'inactiver complètement ou partiellement la commutation gamma vers bêta pour le chromosome 11 considéré. On distingue également le polymorphisme *HBG2:c.-211C>T* dit «*XmnI* », du nom de l'enzyme de restriction utilisée historiquement pour sa détermination. Ce polymorphisme n'induit pas à proprement parler une PHHF mais il a été associé à une sensibilité de réactivation des gènes gamma-globine en cas de stimulation de l'érythropoïèse. D'autres modificateurs de l'expression ou « Quantitative Trait Loci (QTL) » de l'HbF ont été mis en évidence au niveau de l'intron 2 du gène *BCL11A* (chromosome 2) et de l'espace inter-génique *HBSIL-MYB* (chromosome 6). Hormis quelques exceptions (6), l'augmentation d'HbF causée par des PHHF mutationnelles dépasse rarement le seuil de 10%.

Les PHHF délétionnelles sont causées par de larges délétions du cluster  $\beta$ -globine qui emportent les gènes *HBB* et *HBD* tout en laissant intacts les gènes  $\gamma$ -globine. Ces délétions ont comme caractéristique commune d'emporter une séquence de régulation comprise entre les gènes *HBG1* et *HBB*, essentielle pour l'inactivation physiologique des gènes  $\gamma$ -globine (7). Ceci explique la persistance d'un taux d'HbF à un niveau d'au moins 15-20% chez un hétérozygote adulte.

En-dehors de l'augmentation d'HbF qu'elles induisent, les PHHF n'ont habituellement pas de conséquence biologique ou clinique notable, sauf chez les patients atteints de SDM ou de syndrome bêta-thalassémique pour qui elles représentent un facteur majeur atténuant la sévérité clinique.

## 2.2 Diagnostic moléculaire

### 2.2.1 Techniques disponibles

#### 2.2.1.1 Cas index

Les gènes de globine étant très courts (environ 1600 pb et 3 exons seulement) et extrêmement homologues, le **séquençage Sanger** reste à l'heure actuelle une technique de choix pour la recherche d'anomalies de l'hémoglobine. La seule exception est la suspicion d'alpha-thalassémie: en effet, plus de 90% des anomalies responsables d'une alpha-thalassémie étant des délétions, on éliminera en première intention les délétions les plus fréquentes (-3.7 Kb; -4.2 Kb; -20.5 Kb; SEA et MED) au moyen de techniques de gap-PCR unitaire ou multiples dédiée(s) (8, 9) ou de technique MLPA. Le

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**Référence : **ANPGM\_137**  
Page 8/31Numéro de version : **1**

séquençage Sanger des gènes *HBB* ou *HBA1/HBA2* peut également être précédés d'une recherche des mutations les plus fréquentes au moyen de kits spécifiques de reverse dot-blot (10).

En cas de négativité de ces recherches et de forte suspicion de thalassémie alpha ou bêta, une recherche de grands réarrangements par MLPA (multiplex ligation probe amplification) ou QMPSF (quantitative PCR of short fluorescent fragments) pourra être envisagée. De même, une suspicion de PHHF délétionnelle devra donner lieu à une recherche de délétion large emportant l'espace inter-génique entre les gènes pseudo-delta et delta globine. Deux kits commerciaux de MLPA ciblant les clusters alpha et bêta-globine sont disponibles sur le marché. Une fois que le réarrangement (délétion bêta, triplification alpha, etc) a été mis en évidence, sa caractérisation moléculaire précise pourra être confirmée par une gap-PCR spécifique. Un séquençage Sanger des points de cassure pourra être envisagé si la délétion était non décrite jusqu'à présent dans la littérature (11).

Malgré les difficultés techniques inhérentes aux gènes avec de nombreuses séquences répétées, les nouvelles technologies de séquençage haut débit commencent à arriver dans le champ des hémoglobinopathies, principalement en Chine (12). Elles sont surtout intéressantes en termes de gain de temps pour les laboratoires ayant à analyser simultanément un très grand nombre de patients, par exemple dans des programmes nationaux de dépistage de couples-à-risque d'hémoglobinopathies. Les coûts, qui sont actuellement de l'ordre de 30 dollars américains par patient pour un run de 3000 échantillons, devraient rapidement baisser dans les années à venir.

### 2.2.1.2 Cas apparenté

En cas de recherche orientée d'une mutation particulière, des techniques allèle-spécifiques utilisant le FRET (13), la RFLP ou l'ARMS-PCR (14) peuvent être envisagées.

## 2.2.2 Cas index - Principales situations cliniques

### 2.2.2.1 Syndrome drépanocytaire majeur

Un nouveau cas de SDM dépisté par une étude biochimique de l'hémoglobine nécessitera les analyses génétiques suivantes:

- **séquençage bêta-globine (HBB)** pour la différenciation des génotypes S/S et S/ $\beta^0$ -thalassémie ou la confirmation moléculaire des autres génotypes composites de SDM (S/O-Arab, S/D-Punjab, S/E et S/ $\beta^+$ -thalassémie) ;
- **détermination du statut alpha-globine** avec au minimum la recherche orientée de la délétion alpha-thalassémique de -3,7 Kb ;
- **recherche de grands réarrangements du cluster  $\beta$ -globine** en cas de suspicion de génotype S/PHHF (HbF > 15% après 5 ans + Hb totale > 11 g/dL) ou S/Lepore.

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**

 Référence : **ANPGM\_137**  
 Page 9/31

Numéro de version : 1

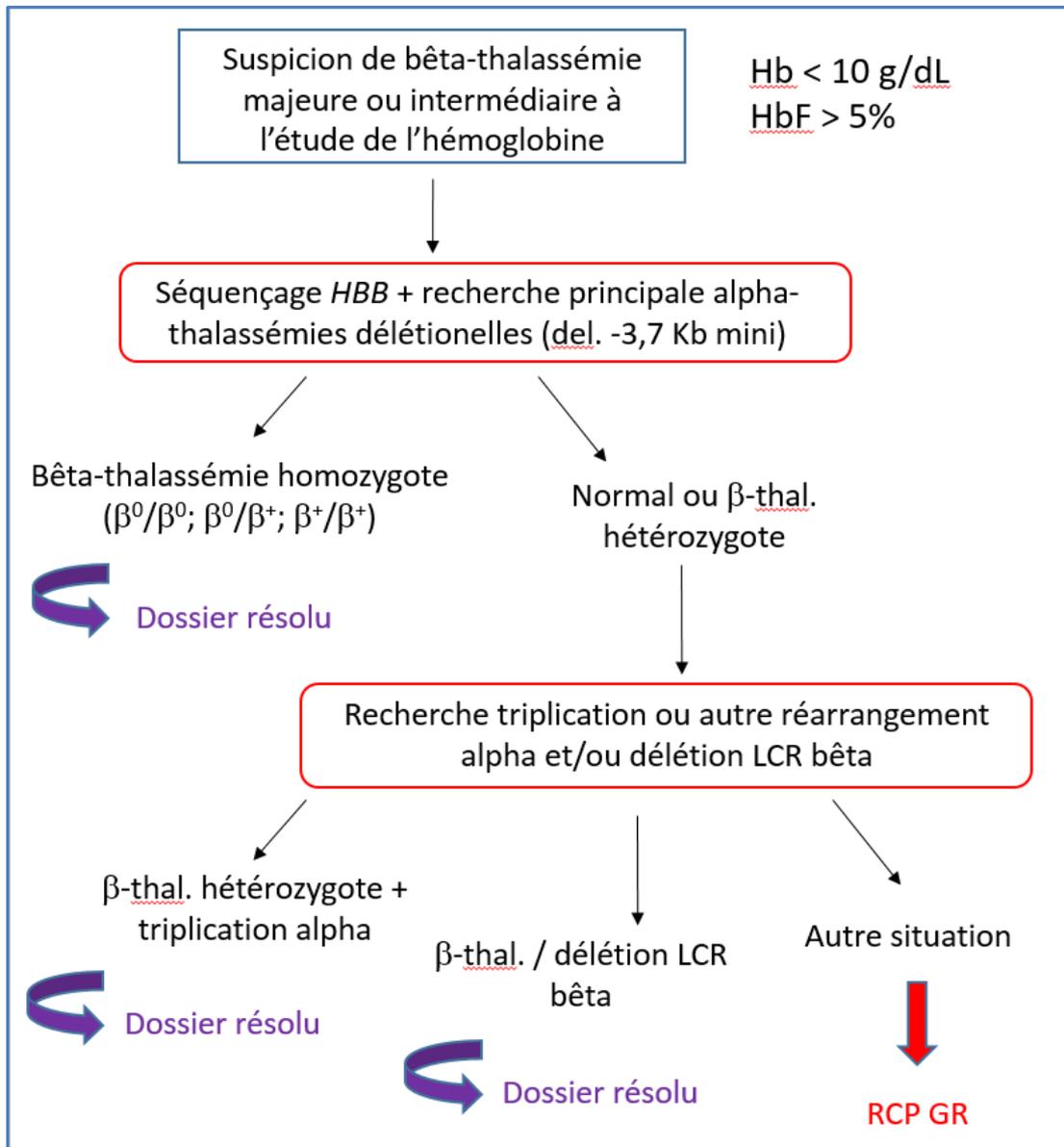
**2.2.2.2 Bêta-thalassémie majeure ou intermédiaire**


Figure 2 : Arbre décisionnel pour le diagnostic moléculaire d'une bêta-thalassémie majeure ou intermédiaire. LCR : Locus Control Region.

Pour les jeunes enfants de moins de 5 ans, il peut être utile de proposer au clinicien le calcul du 'Thalassemia Severity Score' (TSS) via un web calculator accessible sur <http://tss.unica.it/>. Ce score permet d'estimer l'âge attendu de la première transfusion sanguine en fonction des génotypes alpha / bêta-globine et de la présence ou non de certains polymorphismes inducteurs de l'HbF (15).

**2.2.2.3 Trait bêta-thalassémique**

Un trait bêta-thalassémique « classique » au phénotype de l'hémoglobine (HbA<sub>2</sub> entre 4 et 6% ; HbF < 5% ; microcytose/hypochromie +/- légère anémie) **ne nécessite pas de caractérisation**

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**

 Référence : **ANPGM\_137**  
 Page 10/31

Numéro de version : 1

**moléculaire** par séquençage *HBB* sauf dans un contexte de conseil génétique (différenciation  $\beta^0$  ou  $\beta^+$ -thalassémie) pour un couple à risque de bêta-thalassémie majeure ou intermédiaire.

Une augmentation du taux d'HbA<sub>2</sub> sans microcytose/hypochromie franche nécessite en revanche un séquençage  $\beta$ -globine pour un diagnostic différentiel avec une autre cause d'élévation d'HbA<sub>2</sub>.

#### 2.2.2.4 Alpha-thalassémie

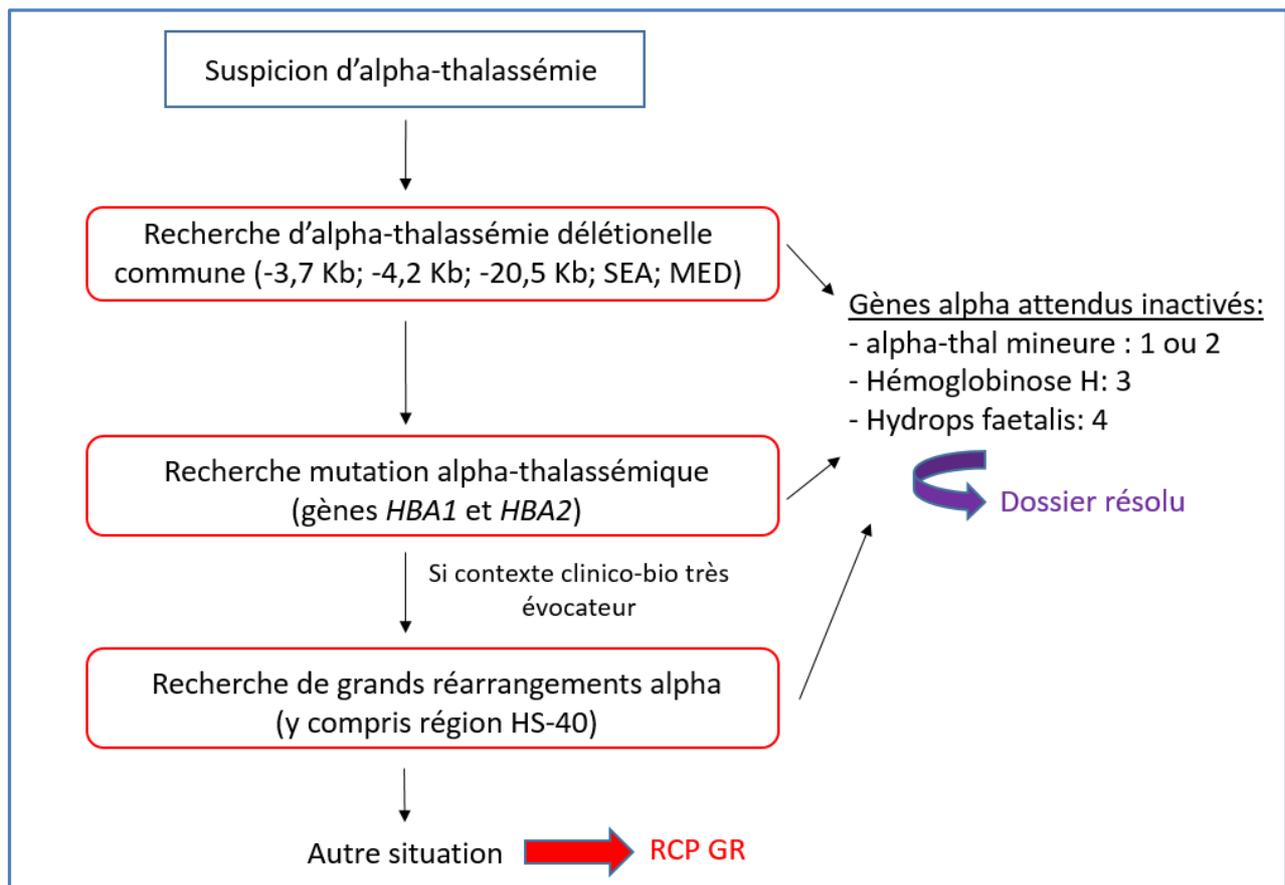


Figure 3 : Arbre décisionnel pour le diagnostic moléculaire d'une alpha-thalassémie.

#### 2.2.2.5 Variant de l'hémoglobine

La caractérisation moléculaire d'un variant de l'hémoglobine détecté lors d'un bilan phénotypique n'est indiquée que si l'on suspecte un variant pathogène.

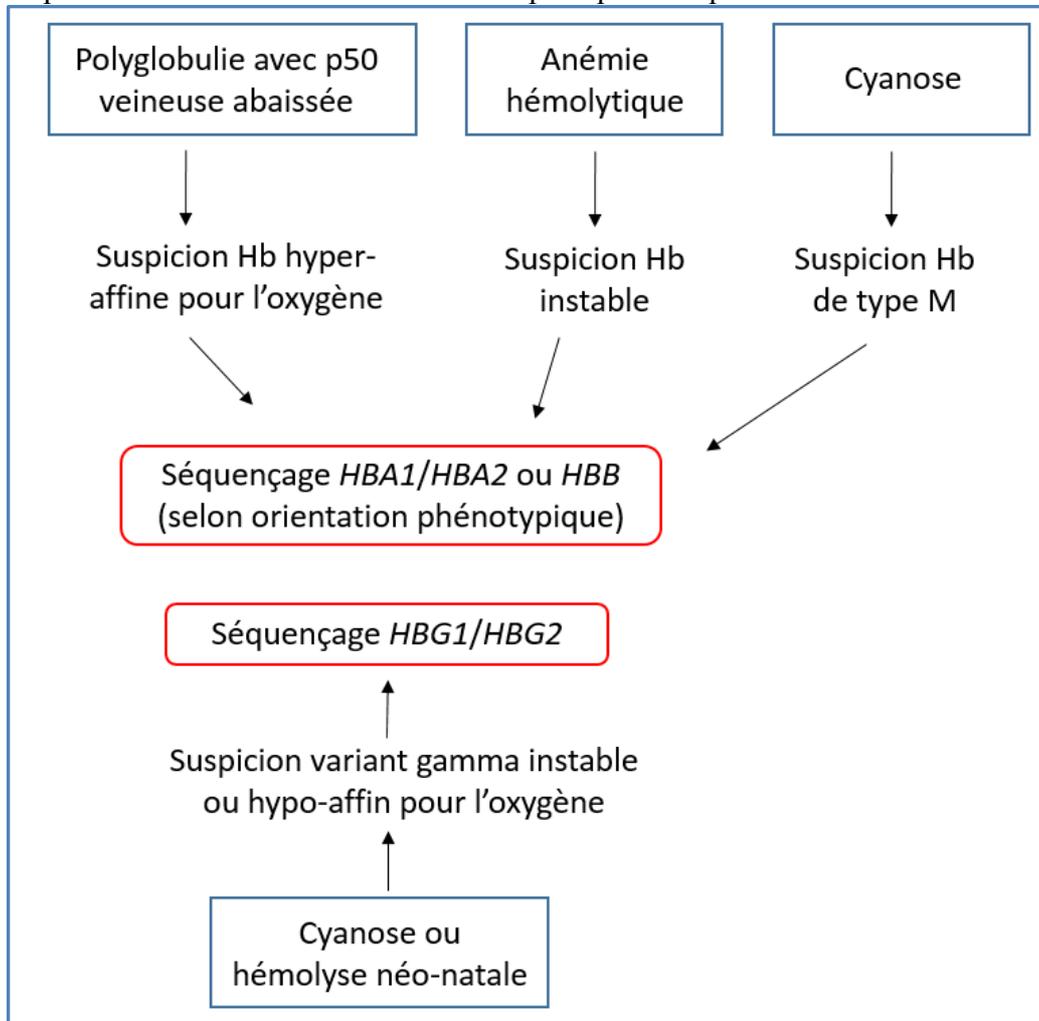
En pratique, les variants pathogènes les plus fréquents (HbS, C, D-Punjab, O-Arab et Lepore) peuvent être caractérisés avec une quasi-certitude au moyen d'un bilan de l'hémoglobine à 3 techniques bien conduit.

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**

 Référence : **ANPGM\_137**  
 Page 11/31

Numéro de version : 1

Les principales autres situations rencontrées en pratique clinique sont détaillées ci-dessous :



**Figure 4 : Situations cliniques nécessitant la caractérisation moléculaire d'un variant de l'hémoglobine détecté ou suspecté au bilan phénotypique.**

#### 2.2.2.5 Variant delta ou delta-thalassémie

Un variant delta de l'hémoglobine objectivé par une duplication du pic d'HbA<sub>2</sub> en électrophorèse capillaire ou en CLHP cations ne nécessite pas une caractérisation moléculaire.

Une suspicion de delta-thalassémie peut nécessiter une confirmation moléculaire afin de documenter un taux anormalement bas d'HbA<sub>2</sub> (< 2%) sans autre étiologie retrouvée.

#### 2.2.2.6 Augmentation du taux d'HbF (âge > 5 ans)

Un taux d'HbF entre 5 et 15% avec hémogramme et taux HbA<sub>2</sub> normaux évoquent une PHHF mutationnelle qui ne nécessite pas de caractérisation génétique sauf demande motivée du clinicien. Auquel cas, un séquençage des régions promotrices des gènes *HBG1* et *HBG2* sera fait en 1<sup>ère</sup> intention.

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**

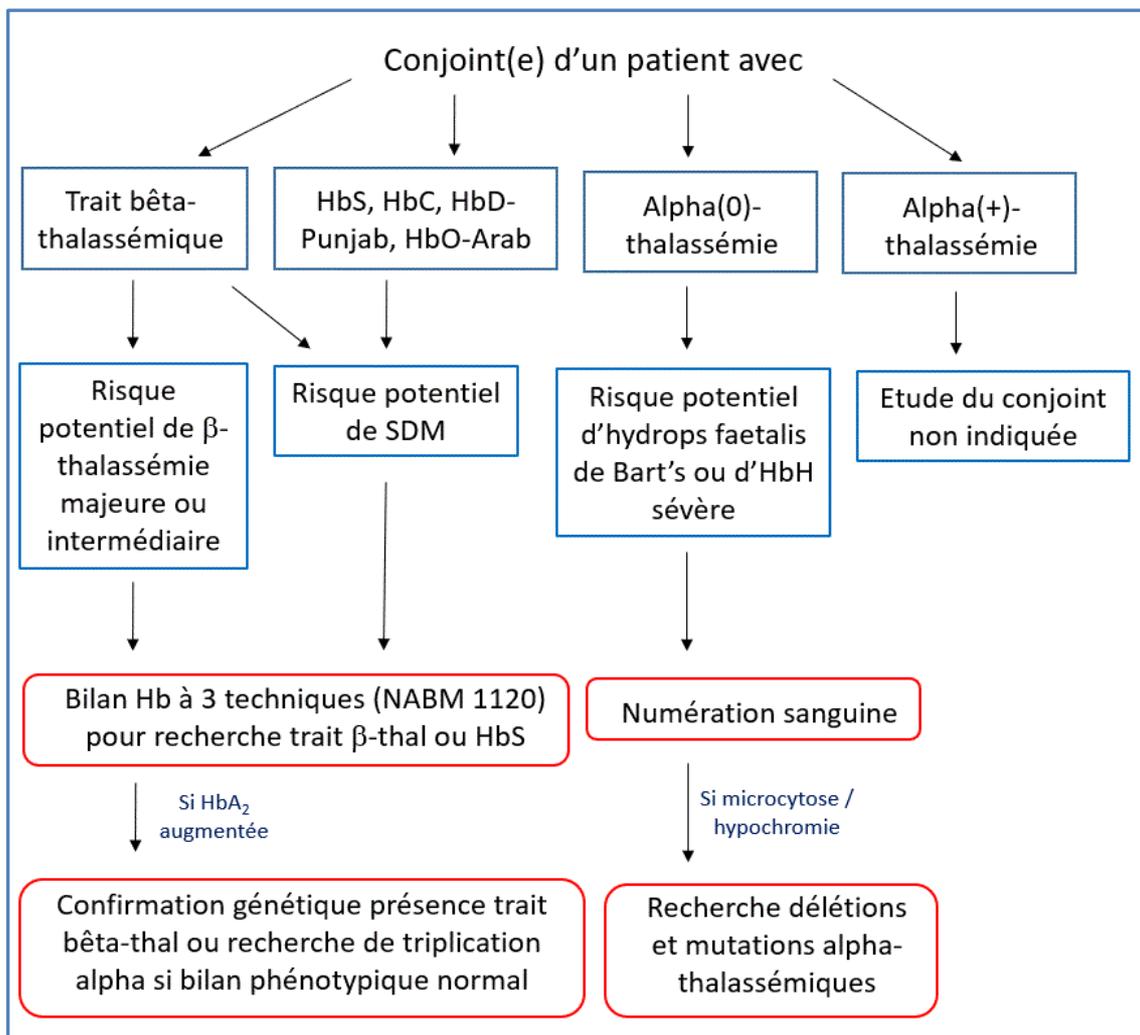
 Référence : **ANPGM\_137**  
 Page 12/31

Numéro de version : 1

Un taux d'HbF supérieur à 15% évoque une  $(\delta\beta)^0$ -thalassémie ou une PHHF délétionnelle. Une recherche de large délétion du cluster bêta-globine est alors indiquée.

### 2.2.3. Conjoint d'un patient porteur hétérozygote d'une hémoglobinopathie et diagnostic pré-nataux (DPN)

Le but est d'identifier les couples à risque d'une forme sévère d'hémoglobinopathie pour le fœtus: syndrome drépanocytaire majeur (SDM), bêta-thalassémie majeure ou intermédiaire.



**Figure 5 : Explorations phénotypiques et génétiques à effectuer chez le conjoint d'un patient porteur d'une hémoglobinopathie à l'état hétérozygote.**

Les grossesses à risque de SDM ou de bêta-thalassémie majeure ou intermédiaire sont candidates à un DPN.

En ce qui concerne les alpha-thalassémies, l'hydrops faetalis est une indication de DPN, contrairement à l'hémoglobinosose H, sauf pour certaines formes particulièrement sévères d'HbH mutationnelle.

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**Référence : **ANPGM\_137**  
Page 13/31

Numéro de version : 1

## 2.2.4 Rendu du résultat et cotation

### 2.2.4.1 Cas index et apparenté

Le compte-rendu de résultat génétique devra associer impérativement toutes les analyses réalisées pour étudier les clusters alpha et bêta-globine et proposer une conclusion commune sous forme d'interprétation clinico-biologique des résultats.

En l'absence de code nomenclature dédié à la recherche d'hémoglobinopathies, les laboratoires du groupe DHOS "Pathologie héréditaire de l'érythrocyte" utilisent le forfait B500 (avec le code NABM 4082) pour la cotation séparée des clusters alpha et bêta-globine, et ce quel que soit le nombre de techniques utilisées. Le diagnostic moléculaire des hémoglobinopathies est en effet réalisé afin d'offrir la possibilité ultérieure ou immédiate d'un diagnostic prénatal. Si une technique MLPA doit être réalisée, il est possible, de la coter en supplément avec le code B043 (BHN 500). Les analyses faites à l'acte (gap-PCR, ratios alpha/bêta, etc) peuvent être cotées en BHN non facturables. Notre groupe a proposé en 2017 (à l'occasion de la révision de la liste des actes complémentaires) la création d'un code générique NABM à B700 « **Screening génétique des hémoglobinopathies par l'étude des clusters alpha- et/ou bêta-globine selon le contexte clinico-biologique** ».

### 2.2.4.2 Diagnostic pré-natal (DPN)

**Syndrome drépanocytaire majeur:** NABM 4054 qui comprend étude moléculaire du fœtus et des parents/apparentés.

**Bêta-thalassémie majeure ou intermédiaire:** NABM 4055 (2 mutations) ou 4056 (+ de 2 mutations).

**Alpha-thalassémie majeure:** NABM 4058 (avec antécédents familiaux connus) ou 4059 (sans antécédents familiaux connus).

## 3. Enzymopathies fréquentes du globule rouge

### 3.1 Pathologie moléculaire – Corrélation phénotype-génotype

#### 3.1.1 Introduction

Les déficits en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et en pyruvate kinase (PK) sont les deux enzymopathies du globule rouge les plus fréquentes, avec néanmoins une prévalence beaucoup plus forte pour la première que pour la seconde. Un dosage biochimique de 1<sup>ère</sup> intention est effectué pour diagnostiquer un déficit de l'une ou l'autre de ces deux enzymes. Le génotypage ne sert alors qu'à confirmer le diagnostic et à typer le variant en cause. Néanmoins, dans certaines circonstances particulières (transfusion ou crise hémolytique récente, femme déficitaire hétérozygote en G6PD, coexistence d'une maladie hémolysante, nouveau-né), l'interprétation du dosage biochimique peut être faussée avec un risque de faux négatif et seul le génotypage permet d'apporter un diagnostic définitif. D'un point de vue cytologique, la présence d'hémighosts sur le frottis sanguin est quasiment pathognomonique d'une hémolyse aiguë causée par un déficit en G6PD (16).

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**Référence : **ANPGM\_137**  
Page 14/31

Numéro de version : 1

### 3.1.2 Déficit en G6PD

Le gène *G6PD* est localisé sur le chromosome X. Le transcrit habituellement utilisé (NM\_001042351) comporte 13 exons (dont le premier n'est pas codant) et 515 acides aminés. La quasi-totalité des anomalies décrites sur ce gène sont des mutations ponctuelles faux-sens ou non-sens, les délétions étant extrêmement rares. Les variants déficitaires de la G6PD qui en résultent ont été catégorisés en 3 classes par l'OMS en fonction de leur activité résiduelle :

- **les variants de classe I** sont les plus sévères en raison d'une activité résiduelle quasi-nulle. A l'état hémizygote (1 à 2% d'activité résiduelle) (17, 18), ils s'accompagnent d'un tableau d'anémie hémolytique chronique, aggravée en cas de stress-oxydant (infections, aliments, médicaments, etc), qui nécessite un recours très fréquent aux transfusions. De façon paradoxale, les femmes porteuses de ce type de variant ont souvent un taux de G6PD normal en raison d'une sélection clonale ou d'une lyonisation préférentielle du chromosome X « muté » par rapport au chromosome X sain. Ceci pose un réel problème pour le conseil génétique puisque le dosage biochimique de la G6PD ne permet pas le plus souvent de détecter les femmes conductrices avant qu'elles ne donnent naissance à un garçon atteint. La pathologie Orphanet associée est la 466026: *déficit en glucose-6-phosphate deshydrogenase classe I*;

- **les variants de classe II et III** ont des activités résiduelles plus élevées (activité résiduelle 5 à 10% pour classe II et 10 à 60% pour classe III) et sont associés à des épisodes d'anémies hémolytiques aiguës chez les patients hémizygotes ou homozygotes dans la période néo-natale où le risque principal est l'ictère nucléaire qui peut être important. En revanche, les patients peuvent développer une crise hémolytique aiguë en cas de stress oxydant. Les principaux facteurs déclenchants sont l'ingestion de fèves, les médicaments et les épisodes infectieux. En France et dans le bassin méditerranéen, plus de 80-90% des déficits en G6PD sont causés par les variants A(-) et Med. La pathologie Orphanet associée est la 362 : *NON RARE EN EUROPE – Déficit en glucose-6-phosphate deshydrogénase (Favisme)*. Les femmes hétérozygotes pour un variant de classe II ou III ont souvent une activité sub-normale qui peut facilement passer inaperçue au dosage biochimique sauf si celui-ci est normalisé par rapport à une autre enzyme du globule rouge (hexokinase par exemple). Mais même dans ce cas-là, environ 25% des déficits hétérozygotes restent méconnus.

### 3.1.3 Déficit en PK

Le gène *PKLR* est localisé sur le chromosome 2 et comporte 12 exons qui donnent par épissage alternatif deux transcrits : le premier (NM\_181871; 11 exons et 543 acides aminés) code l'isoenzyme L (pour liver) de la PK qui est principalement exprimé dans le foie ; le second (NM\_000298) code l'isoenzyme R (pour Red blood cell) qui est lui exprimé dans les globules rouges. Ce dernier transcrit donne naissance à une protéine de 574 acides-aminoés. Les anomalies décrites sur ce gène sont très majoritairement des mutations ponctuelles faux-sens ou non-sens même si quelques délétions larges ont été décrites. En-dehors de quelques variants fréquents (en particulier p.Arg510Gln pour le Nord de l'Europe et p.Arg486Trp pour le Sud de l'Europe), la majorité des variants PK résulte de mutations privées. Seuls les homozygotes (ou hétérozygotes composites) présentent un tableau d'anémie hémolytique plus ou moins marqué, ce dernier pouvant être très frustré ou évoquer, à l'inverse, une  $\beta$ -thalassémie intermédiaire voire majeure avec surcharge martiale associée (19). La pathologie Orphanet associée est : 766: *anémie hémolytique due à un déficit en pyruvate kinase du globule rouge*.

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**Référence : **ANPGM\_137**  
Page 15/31

Numéro de version : 1

## 3.2 Diagnostic moléculaire

### 3.2.1 Techniques disponibles

Une recherche génétique de déficit en G6PD et/ou PK devrait être toujours précédée des dosages biochimiques correspondants qui sont très accessibles en France (surtout le dosage de G6PD), à la différence des autres déficits enzymatiques du globule rouge. Chez les nouveaux-nés et jeunes enfants qui sont souvent très réticulocytaires (dosage faussé), le dosage des parents est primordial en cas de suspicion de déficit biochimique en PK.

Dans un contexte de recherche orientée sur arguments phénotypiques, le séquençage Sanger reste la méthode la plus 'coût-efficace' même si le NGS est tout à fait envisageable et réalisable via le panel 'Enzymopathies du GR' décrit plus bas.

Pour le déficit en G6PD, étant donné que deux variants (Med et A-) sont responsables de plus de 90% des anomalies dans le bassin méditerranéen, une recherche dédiée par technique allèle-spécifique peut être envisagée (20).

Pour le déficit en PK, aucune mutation ne se distingue vraiment en terme de fréquence allélique ce qui rend la recherche ciblée de mutation inappropriée pour le cas index. En cas de dosage anormal avec absence d'anomalie au séquençage *PKLR*, la recherche de grand réarrangement par MLPA dédié est l'étape suivante à mettre en œuvre avant une réévaluation phénotypique et clinico-biologique du dossier en RCP.

### 3.2.2 Indications du diagnostic moléculaire

#### 3.2.2.1 Cas index ou apparenté

Un dosage biochimique abaissé de G6PD érythrocytaire, éventuellement confirmé sur un second prélèvement, est suffisant pour poser le diagnostic de déficit. Conformément aux recommandations du dernier PNDS sur cette maladie, la caractérisation moléculaire d'un déficit en G6PD n'est nécessaire que dans les cas suivants:

- suspicion clinique (hémolyse chronique, contexte familial) de déficit de classe I,
- dosages biochimiques difficilement interprétables (transfusion récente, régénération érythropoïétique, etc),
- suspicion de femme porteuse hétérozygote d'un variant déficitaire en G6PD,
- suspicion d'association d'un déficit en G6PD avec d'autres pathologies érythrocytaires: un séquençage NGS avec les panels décrits ci-dessous sera alors préféré en 1<sup>ère</sup> intention.

Une suspicion de déficit biochimique en PK devra toujours faire l'objet d'une confirmation moléculaire car:

- contexte d'anémie hémolytique chronique régénérative ou de multi-transfusions qui rend souvent le dosage difficilement interprétable, surtout chez les jeunes enfants;
- les déficitaires hétérozygotes sont difficiles à dépister sur le seul dosage biochimique;
- l'AG-348, activateur médicamenteux de la PK actuellement en phase d'essai clinique, ne fonctionne que dans les déficits causés par une mutation faux sens au niveau du site actif de l'enzyme (21).

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**Référence : **ANPGM\_137**  
Page 16/31

Numéro de version : 1

### 3.2.2.2 Dépistage pré-natal (DPN)

Un DPN peut se justifier pour les grossesses à risque de déficit homozygote en PK ou de déficit en G6PD de classe I, le plus souvent après accord du CPDPN local (Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Pré-Natal).

### 3.2.3 Cotation

#### 3.2.3.1 Cas index et apparenté

- Recherche orientée de mutation : N903 (BHN 140)
- Par séquençage Sanger : N906 (BHN 570) x 5 (interdit de coter plus de 5 exons en séquençage Sanger)
- Par séquençage NGS : cotation selon la taille du panel utilisé (Cf. plus bas)

#### 3.2.3.1 DPN

Les DPN de déficits en G6PD et PK n'étant pas inscrits en tant que tels à la NABM, on utilisera le code NABM 4083 : 'DPN PROPREMENT DIT : AUTRES INFECTIONS GENETIQUES'.

## 4. Autres pathologies rares du globule rouge

### 4.1 Pathologie moléculaire – Corrélation phénotype-génotype

#### 4.1.1 Membranopathies érythrocytaires constitutionnelles

##### 4.1.1.1 Introduction

Il s'agit principalement de la sphérocytose héréditaire, de l'elliptocytose héréditaire et des stomatocytoses héréditaires. Il existe aussi des formes atypiques telles que les sphéro-elliptocytoses. Plusieurs gènes sont en cause dans chacune de ces trois pathologies et des anomalies différentes d'un même gène peuvent se traduire par des maladies différentes. Par exemple, des mutations de *SPTA1* sont décrites dans la sphérocytose et l'elliptocytose héréditaire ou des mutations de *SLC4A1* dans la sphérocytose, l'ovalocytose et la stomatocytose héréditaire (22, 23). Les maladies Orphanet associées et les gènes correspondants sont listés en Annexe 2.

##### 4.1.1.2 Sphérocytose héréditaire (Maladie de Minkowski Chauffard)

La sphérocytose héréditaire (SH) est la cause la plus fréquente d'hémolyse constitutionnelle dans la population d'origine caucasienne. La présentation typique est celle d'une anémie hémolytique chronique de sévérité modérée. Le phénotype clinique est néanmoins très variable, allant de l'hémolyse compensée à l'anémie hémolytique sévère nécessitant de fréquentes transfusions. La transmission est dominante dans environ 70% des cas mais elle peut aussi être récessive. Des formes *de novo* sont également décrites. Le diagnostic de sphérocytose héréditaire est phénotypique, basé sur les constantes et la morphologie érythrocytaires et sur le test de liaison des globules rouges à

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**Référence : **ANPGM\_137**  
Page 17/31

Numéro de version : 1

l'éosine 5' maléimide (test EMA), qui peuvent être associés à l'ektacytométrie ou à des tests d'hémolyse (résistance globulaire osmotique, Pink test...) (24).

Cette pathologie est due à un déficit d'une des protéines constitutives du cytosquelette érythrocytaire: l'ankyrine, les spectrines alpha et beta, la protéine 4.2 et la bande 3, codées respectivement par les gènes *ANK1*, *SPTA1*, *SPTB*, *EPB42* et *SLC4A1*. Ces gènes comportent entre 20 et 50 exons, présentent d'assez nombreux polymorphismes et les mutations en cause sont nombreuses. Peu de corrélations phénotype-génotype ont été réalisées à ce jour puisque le génotypage n'est pas systématique. Il existe néanmoins une corrélation claire entre le degré de microcytose et sévérité clinique. Le génotypage est recommandé dans (i) les formes sévères ou à révélation néonatale ou *in utero*, (ii) les formes atypiques ou de transmission non dominante (suspicion de CDA), et (iii) dans les formes où des associations de pathologies érythrocytaires sont suspectées afin de confirmer le diagnostic ou de préciser la ségrégation familiale.

#### 4.1.1.3 Elliptocytose et pyropoïkilocytose héréditaires - ovalocytose mélanésienne

L'elliptocytose héréditaire est une anomalie génétique entraînant une fragilité du cytosquelette érythrocytaire. Elle est due à un défaut de la spectrine alpha (gène *SPTA1*) le plus souvent, de la spectrine beta (gène *SPTB*) ou de la protéine 4.1 (gène *EPB41*). Elle est présente principalement chez les populations d'origine africaine, rarement européenne. Dans sa forme la plus fréquente, de transmission dominante, un seul allèle est atteint et elle est peu ou pas symptomatique hormis en période néonatale. Le diagnostic est phénotypique, basé sur les indices et la morphologie érythrocytaires ainsi que sur l'ektacytométrie. Il existe des formes d'elliptocytose avec anémie hémolytique chronique causées par des facteurs additionnels acquis (carences,...) ou génétiques tel une hémoglobinopathie (de type thalassémie en particulier) ou des polymorphismes du gène *SPTA1* (alpha LELY, alpha LEPR). L'étude génétique peut être indiquée dans ce cas. Elle l'est aussi dans les rares formes sévères à révélation néonatale (formes récessives aussi nommées 'pyropoïkilocytose') dues le plus souvent à l'association d'une mutation elliptocytogène du gène *SPTA1* et du polymorphisme alpha LELY et plus rarement à une homozygotie ou à une double hétérozygotie de mutations du gène *SPTA1*.

L'ovalocytose mélanésienne (SAO) ou ovalocytose du sud-est asiatique est due à une délétion hétérozygote unique de 27 bp de *SLC4A1*. La protéine délétée de 9 acides aminés est exprimée mais de conformation anormale. Il en résulte une anomalie morphologique typique des globules rouges avec des hématies ovalaires de grosse taille et la présence d'une à deux bandes transversales curvilignes. La SAO est habituellement asymptomatique dans sa forme hétérozygote, n'entraînant ni anémie ni hémolyse, hormis durant la période néonatale. Elle peut être symptomatique lorsqu'associée à une autre mutation de *SLC4A1* en *trans*. Elle est létale *in utero* à l'état homozygote.

#### 4.1.1.4 Stomatocytoses héréditaires

Les stomatocytoses héréditaires sont les membranopathies érythrocytaires dont les gènes sont les plus récemment décrits. Elles sont dues à une anomalie d'un transporteur d'ions ou de glucose de la membrane érythrocytaire. La transmission est dominante, des formes *de novo* sont décrites. On distingue différentes formes, deshydratées (xérocytose) ou hyperhydratées. Elles sont caractérisées par une hémolyse chronique plus ou moins marquée, une anémie ou non, une surcharge martiale

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**Référence : **ANPGM\_137**  
Page 18/31

Numéro de version : 1

fréquente, ainsi que des symptômes spécifiques selon les gènes impliqués. Elles peuvent être diagnostiquées à tout âge.

La forme la plus fréquente est liée à des mutations hétérozygotes gain de fonction du gène *PIEZO1*, un canal cationique activé par la pression mécanique. Il s'agit de la xérocytose héréditaire ou stomatocytose à cellules deshydratées de type 1 (DHS1). Outre les symptômes décrits, on observe dans environ 20% des familles, des œdèmes périnataux, parfois sévères. Le diagnostic est fait le plus souvent par ektacytométrie. Au plan génétique, il existe quelques mutations récurrentes (faux sens majoritairement ou petite délétion), qui permettent d'affirmer le diagnostic. Néanmoins, dans environ 2/3 des familles, on observe des mutations privées qui doivent être confrontées aux tests phénotypiques, et ce d'autant plus qu'il existe de très nombreux polymorphismes de *PIEZO1*.

Des mutations ponctuelles hétérozygotes du gène *KCNN4*, qui code pour un canal potassique, le canal Gardos, sont responsables d'une autre forme de stomatocytose héréditaire, aussi appelée DHS2 ou canalopathie Gardos, environ 10 fois moins fréquente que la précédente. Ces mutations affectent le site de liaison à la calmoduline, entraînant une hyperactivation du canal. A l'heure actuelle, trois mutations ponctuelles sont décrites dont l'une est récurrente (p.Arg352His). L'ektacytométrie normale ou subnormale, ne permet pas de faire le diagnostic, qui est nécessairement génétique. Il s'agit d'une anémie hémolytique franche avec surcharge martiale, qui peut être associée à une anémie foetale ou néonatale sévère.

D'autres gènes sont responsables de stomatocytoses héréditaires, moins fréquentes et plus souvent de type hyperhydratées, il s'agit de *SLC4A1* et *RHAG*. La stomatocytose peut aussi s'inscrire dans un cadre syndromique, associée à des troubles neurologiques s'il s'agit de mutation de *SLC2A1*, codant GLUT1, transporteur du glucose, ou d'anomalies lipidiques et plaquettaires avec les mutations d'*ABCG5*, qui code un transporteur du cholestérol (sistostérolémie ou phytostérolémie).

#### 4.1.2 Enzymopathies rares du globule rouge

Les enzymopathies très rares du globule rouge font partie du groupe des anémies hémolytiques héréditaires non sphérocytaires. Les maladies Orphanet associées et les gènes correspondants sont listés en Annexe 3. Les déficits en glucose-phosphate isomérase (GPI) et pyrimidine 5'-nucléotidase (P5N) se limitent aux globules rouges et se traduisent par une anémie hémolytique plus ou moins importante mais isolée. En revanche, certains déficits comme ceux en triose-phosphate isomérase (TPI) et phospho-glycérate kinase s'expriment dans tout l'organisme et peuvent également être accompagnés de troubles musculaires à type de myopathie et/ou de diverses autres manifestations neurologiques (25).

Le diagnostic différentiel de ces maladies est donc essentiel, également vis-à-vis de la splénectomie qui est recommandée dans certains déficits mais pas dans d'autres. Malheureusement, les dosages biochimiques ne sont plus disponibles en France que dans de rares laboratoires spécialisés et leur interprétation est souvent rendue difficile par la réticulocytose associée. Une normalisation des résultats avec l'hexokinase est donc quasiment indispensable. A l'exception du déficit en P5N qui s'accompagne d'une basophilie marquée des érythrocytes sur le frottis, la morphologie des GR ne permet pas de distinguer ces déficits enzymatiques les uns des autres.

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**Référence : **ANPGM\_137**  
Page 19/31

Numéro de version : 1

D'un point de vue génétique, ce sont toutes des maladies autosomiques récessives, à l'exception du déficit en phospho-glycérate kinase qui est transmis par le chromosome X. Comme pour le déficit en PK, de nombreuses mutations différentes ont été décrites pour chaque gène, souvent restreintes à quelques familles. La recherche de mutations ciblées n'a donc pas de sens, en-dehors d'une recherche orientée chez un apparenté.

#### 4.1.3. Les polyglobulies (érythrocytoses) constitutionnelles

Elles doivent être recherchées dans un contexte de transmission familiale, après élimination des causes secondaires classiques de polyglobulie.

Les polyglobulies constitutionnelles primitives comprennent les très rares mutations du récepteur à l'érythropoïétine classiquement retrouvées dans un contexte familial avec érythropoïétine sérique diminuée, et les mutations du gène *SH2B3* qui code la protéine LNK. Ces mutations peuvent être recherchées isolément, mais sont actuellement mises en évidence dans les explorations NGS qui explorent un grand nombre de gènes cibles.

Pour ce qui est des polyglobulies constitutionnelles secondaires, la cause la plus fréquente (pour ne pas dire la moins rare) est représentée par les hémoglobines hyperaffines qui résultent de mutations des gènes codant les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de globines. Outre le contexte familial très évocateur, la présence d'une P50 **veineuse** diminuée (pression en oxygène pour laquelle 50% de l'hémoglobine est saturée), c'est-à-dire  $< 24$  mmHg, incite à séquencer les gènes codant les chaînes de globine. À ce jour plus de 100 variant ont été répertoriés touchant dans un tiers des cas la chaîne  $\alpha$  est dans deux tiers des cas la chaîne  $\beta$ . À noter cependant que l'absence d'une hémoglobine anormale à l'électrophorèse de l'hémoglobine n'élimine pas la présence d'une hémoglobine hyperaffine qui peut passer inaperçue avec cette technique. A l'opposé, une des causes classiques de polyglobulie constitutionnelle secondaire à P50 basse, est représentée par l'exceptionnel déficit en 2,3 DPG (26). Les autres anomalies responsables de polyglobulies constitutionnelles secondaires touchent les acteurs impliqués dans la régulation de l'hypoxie: Le facteur inductible de l'hypoxie (HIF  $\alpha$ ), les enzymes prolyl hydroxylases PHD responsables de l'hydroxylation de HIF, et le facteur VHL qui participe à la dégradation de HIF.

Une recommandation ANPGM\_124 ayant déjà été écrite sur les érythrocytoses héréditaires, nous renvoyons le lecteur à ce document pour davantage de détails.

#### 4.1.4 Les anémies dysérythropoïétiques congénitales (CDA)

Les anémies dysérythropoïétiques congénitales ou « dysérythropoïèses congénitales » (CDA – Orpha 85) sont un groupe hétérogène de maladies qui se caractérisent par une érythropoïèse inefficace (dysérythropoïèse), des anomalies cytologiques des précurseurs érythroïdes dans la moelle osseuse et une surcharge martiale. Cinq types ont été identifiés et se caractérisent par les anomalies cytologiques suivantes (27):

- (i) CDA I: macrocytes, des érythroblastes mégalo-blastoïdes avec ponts interchromatiniens internucléaires et des binucléarités avec des noyaux à des stades différents de maturation (3-7% d'érythroblastes polychromatophiles et acidophiles),
- (ii) CDA II: érythroblastes polychromatophiles et acidophiles binucléés avec 10 à 40% des érythroblastes avec deux noyaux au même stade de maturation,

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**Référence : **ANPGM\_137**  
Page 20/31

Numéro de version : 1

- (iii) CDA III: érythroblastes géants multinucléés avec atteinte de l'ensemble des précurseurs,
- (iv) CDA IV: importante érythroblastémie
- (v) la thrombocytopénie avec CDA.

Les gènes associés à ces 5 types de CDA sont listés en Annexe 4. La CDA I et II se transmettent de manière autosomique récessive, tandis que la CDA III et IV sont transmises de manière autosomique dominante. Le mode d'hérédité de la thrombocytopénie avec CDA est lié à l'X. Un conseil génétique est possible pour tous les types de CDA avec une mutation connue. Le génotypage est justifié dans tous les cas après étude phénotypique incluant obligatoirement une numération-formule avec compte réticulocytaire, myélogramme, bilan d'hémolyse et bilan martial.

Les premières manifestations de CDA surviennent généralement au cours de l'enfance ou chez l'adulte jeune. Cependant, des formes plus sévères existent avec une révélation néonatale ou parfois *in utero* avec *hydrops fetalis*. Les signes communs aux CDA I, II et III sont:

- (i) une anémie d'intensité variable, macrocytaire ou normocytaire avec un compte réticulocytaire inapproprié par rapport au degré de l'anémie, témoin de l'érythropoïèse inefficace, (ii) un ictère à bilirubine libre du fait de l'hémolyse intra-médullaire, (iii) une splénomégalie, (iv) une hémochromatose secondaire (CDAI > CDAII) avec ferritine élevée et hepcidine basse de façon inappropriée et (v) des signes phénotypiques propres associés aux différentes formes (syndactylies des 4<sup>èmes</sup> et 5<sup>èmes</sup> orteils dans les CDAI ; dégénérescence de la macula et gammopathies monoclonales dans les CDAIII, etc..).

La CDAII, bien que rare, est la forme de CDA la plus fréquemment observée. Elle est parfois confondue avec une sphérocytose héréditaire compte tenu de la présence de sphérocytes sur les frottis sanguins et une courbe éktacytométrique parfois similaire à celle d'une SH. Le pincement de la bande 3 sur l'électrophorèse des protéines de la membrane érythrocytaire est typique de la CDAII mais ce test fonctionnel est, du fait du développement du séquençage haut-débit, actuellement peu réalisé.

#### 4.1.5 Les anémies sidéroblastiques constitutionnelles

Les anémies sidéroblastiques (Orpha 1047) constituent un groupe hétérogène d'anomalies rares de la moelle osseuse pouvant être héréditaires ou acquises. Les formes acquises peuvent être secondaires, causées par un déficit nutritionnel ou l'ingestion de toxiques ou de médicaments (antituberculeux, chloramphénicol, divers cytostatiques, etc). Elles peuvent aussi être primaires, causées par des syndromes myélodysplasiques ou myéloprolifératifs. Ces formes acquises sont les plus fréquentes et leur diagnostic d'exclusion doit être fait avant d'envisager une anémie sidéroblastique constitutionnelle.

Les formes constitutionnelles peuvent être isolées ou syndromiques (28). Elles se caractérisent par une diminution de la synthèse d'hémoglobine due à un défaut de l'utilisation du fer, avec des taux de fer plasmatique normaux ou élevés et une surcharge en fer tissulaire fréquente. Elles sont définies par la présence de sidéroblastes en couronne dans la moelle osseuse (mis en évidence par la coloration de Perls) en raison d'une accumulation pathologique de fer dans les mitochondries des érythroblastes. Les gènes et syndromes impliqués dans les anémies sidéroblastiques constitutionnelles sont listés en Annexe 5.

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**Référence : **ANPGM\_137**  
Page 21/31Numéro de version : **1**

Le diagnostic génétique spécifique d'une anémie sidéroblastique constitutionnelle pour un traitement adéquat et sa compliance et dans un cadre de conseil génétique familial avec proposition éventuelle de diagnostic pré-natal pour les couples à risque. Des examens complémentaires peuvent également être requis : examen neurologique, IRM cérébral, biopsie musculaire et culture de fibroblastes pour étudier le métabolisme mitochondrial.

#### 4.1.6 Le syndrome IRIDA

Le syndrome IRIDA (iron refractory iron deficiency anemia), associé à des mutations du gène *TMPRSS6* (Transmembrane protéase sérine 6, NM\_153609) doit être évoqué devant une anémie ferriprive inexplicée, répondant mal au traitement martial per os, après exclusion des causes habituelles de carence en fer.

La transmission est autosomique récessive. Les patients présentent le plus souvent une anémie microcytaire hypochrome depuis la petite enfance, une carence en fer sévère, caractérisée par un fer sérique effondré, une saturation de la transferrine très basse. La ferritine circulante est basse, ou parfois normale. Les patients répondent bien aux injections de fer intraveineux (29).

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**

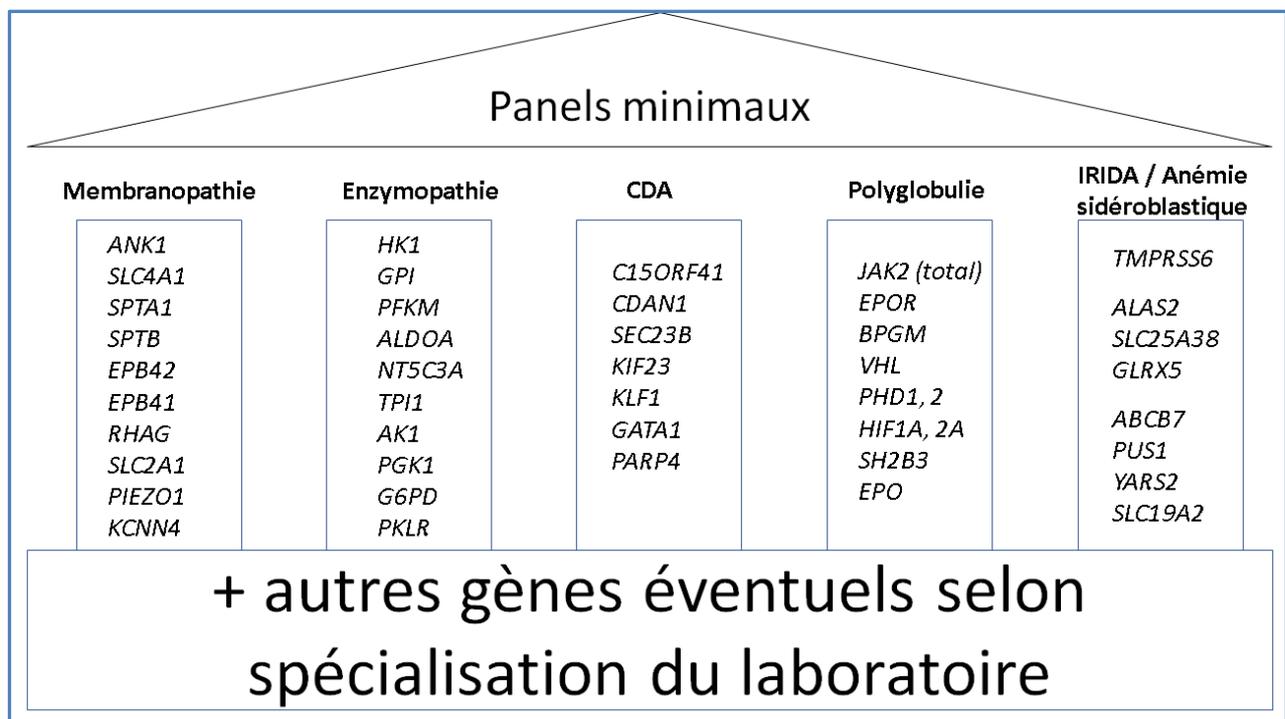
 Référence : **ANPGM\_137**  
 Page 22/31

Numéro de version : 1

## 4.2 Diagnostic moléculaire

En-dehors des hémoglobinopathies et des déficits en G6PD ou PK pour lesquels les méthodes de génotypage conventionnelles décrites ci-dessus restent largement utilisées, le diagnostic génétique des maladies du globule rouge utilise actuellement le séquençage moyen ou haut-débit (NGS).

De façon générale, une exploration clinique et phénotypique la plus complète possible est un pré-requis à toute analyse génétique, y compris par NGS. L'indication du NGS doit être validée par un biologiste et les cas complexes sont discutés en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP).



**Figure 6 : Panels NGS minimaux de gènes en fonction de la pathologie suspectée.**

Le groupe diagnostic de la filière MCGRE a établi les listes minimales de gènes à tester en fonction de l'orientation donnée par la clinique et les examens phénotypiques (Cf. figure 3). Ces listes minimales pourront être élargies selon les spécialisations, spécificités et expertises de chaque laboratoire. L'analyse NGS est réalisée selon les recommandations de l'ANPGM.

La cotation utilisera les forfaits NABM NGS qui sont fonction de la taille du panel réalisé et expertisé: N350 (panel < 20 Kb); N351 (entre 20 et 100 Kb) et N352 (100 à 500 Kb). Quel que soit le mode de capture (y compris exomique), le principe est de ne facturer que les gènes qui ont effectivement été analysés et expertisés. La gestion des découvertes incidentes se fait grâce à une étroite interaction avec les généticiens cliniciens et les conseillers en génétique. Le résultat doit être rendu dans un courrier d'accompagnement avec idéalement un appel au prescripteur. Ce résultat doit être expliqué dans le cadre d'une consultation de génétique et le risque potentiel pour les grossesses suivantes.

Les cas non résolus sont éligibles à des séquençages whole-exome sur les plate-formes SEQUOIA ou AURAGEN après passage du dossier dans la RCP de la filière MCGRE.

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**Référence : **ANPGM\_137**  
Page 23/31

Numéro de version : 1

## Annexe 1 : Hémoglobinopathies (Codes Orphanet)

**Pathologies Orphanet relatives à des hémoglobinopathies alpha:**

- Hydrops fœtal de Bart (Orpha 163596)
- Hémoglobinose H (Orpha 93616)
- Hémoglobinose H acquise avec syndrome myélodysplasique (Orpha 231401)
- Alpha-thalassémie avec déficience intellectuelle liée à l'X ou syndrome ATR-X (Orpha 847)
- Alpha-thalassémie avec déficience intellectuelle liée au chromosome 16 (Orpha 98791)
- Syndrome d'alpha-thalassémie-syndrome myélodysplasique (Orpha 231401)
- Hémoglobinose M (Orpha 330041)
- Hémoglobine instable (Orpha 99139)

**Pathologies Orphanet relatives à des hémoglobinopathies bêta:**

- Drépanocytose (Orpha 232)
- Thalasso-drépanocytose (Orpha 251359)
- Syndrome drépanocytaire majeur (SDM) de type S/C (Orpha 251365)
- SDM de type S/D-Punjab (Orpha 251370)
- SDM de type S/E (Orpha 251375)
- SDM autre (Orpha 251355)
- Bêta-thalassémie dominante (Orpha 231226)
- Bêta-thalassémie intermédiaire (Orpha 231222)
- Bêta-thalassémie majeure (Orpha 231214)
- Delta-bêta thalassémie (Orpha 231237)
- Hémoglobine C - bêta-thalassémie (Orpha 231242)
- Hémoglobine E - bêta-thalassémie (Orpha 231249)
- Hémoglobine Lepore - bêta-thalassémie (Orpha 330032)
- Bêta-thalassémie + autre anomalie Hb (Orpha 231230)
- Bêta-thalassémie - thrombocytopénie liée à l'X (Orpha 231393)
- Bêta-thalassémie - trichothiodystrophie (Orpha 231256)
- Hémoglobinose M (Orpha 330041)
- Hémoglobine instable (Orpha 99139)
- Hémoglobinose C (Orpha 2132)
- Hémoglobinose D (Orpha 90039)
- Hémoglobinose E (Orpha 2133)

**Pathologies Orphanet relatives à des hémoglobinopathies gamma:**

- HbS / PHHF (Orpha 251380)
- PHHF - bêta-thalassémie (Orpha 46532)
- Hémoglobinose M (Orpha 330041)
- Hémoglobine instable (Orpha 99139)
- Hémoglobinopathie Toms River (Orpha 280615)

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**

 Référence : **ANPGM\_137**  
 Page 24/31

 Numéro de version : **1**

## Annexe 2 : Pathologies constitutionnelles de la Membrane du GR - Gènes et codes Orphanet

- **Sphérocytose héréditaire (maladie de Minkowski-Chauffard)** (Orpha 822)  
Gènes *ANK1*, *EPB42*, *SLC4A1*, *SPTA1* et *SPTB*
- **Cryohydrocytose héréditaire avec stomatine normale** (Orpha 398088)  
Gène *SLC4A1*
- **Ovalocytose de l'Asie du Sud-Est** (Orpha 98868)  
Gène *SLC4A1*
- **Stomatocytose héréditaire avec hématies déshydratées** (Orpha 3202)  
Gènes *PIEZO1*, *KCNN4*, *SLC4A1*
- **Elliptocytose familiale** (Orpha 288)  
Gènes *EPB41*, *SPTA1*, *SPTB*
- **Cryohydrocytose héréditaire avec réduction de stomatine** (Orpha 168577)  
Gène *SLC2A1*
- **Stomatocytose héréditaire avec hématies hyperhydratées** (Orpha 3203)  
Gène *RHAG*

<u>Protéine</u>	<u>Gène</u>	<u>NM</u>
Ankyrine	<i>ANK1</i>	NM_020476
Bande 3	<i>SLC4A1</i>	NM_000342
Alpha spectrine	<i>SPTA1</i>	NM_003126
Beta spectrine	<i>SPTB</i>	NM_001024858
Prot 4.2	<i>EPB42</i>	NM_000119
Prot 4.1	<i>EPB41</i>	NM_001166005
RhAg	<i>RHAG</i>	NM_000324
GLUT1	<i>SLC2A1</i>	NM_006516
PIEZO1	<i>PIEZO1</i>	NM_001142864
Gardos	<i>KCNN4</i>	NM_002250

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**

 Référence : **ANPGM\_137**  
 Page 25/31

 Numéro de version : **1**

## Annexe 3 : Enzymopathies rares du GR - Gènes et codes Orphanet

- **Anémie hémolytique non sphérocytaire par déficit en hexokinase** (Orpha 90031)  
Gène *HK1*
- **Anémie hémolytique due à un déficit en phosphoglucose isomérase** (Orpha 712)  
Gène *GPI*
- **Glycogénose par déficit en phosphofructokinase musculaire** (Orpha 371)  
Gène *PFKM*
- **Glycogénose par déficit en aldolase A musculaire** (Orpha 57)  
Gène *ALDOA*
- **Déficit en triose-phosphate isomérase** (Orpha 868)  
Gène *TPI1*
- **Anémie hémolytique due à un déficit en adénylate-kinase** (Orpha 86817)  
Gène *AK1*
- **Glycogénose par déficit en phosphoglycérate kinase 1** (Orpha 713)  
Gène *PGK1*
- **Anémie hémolytique due à un déficit en pyrimidine 5'-nucléotidase** (Orpha 35120)  
Gène *NT5C3A*

<u>Protéine</u>	<u>Ref gène</u>	<u>NM</u>	<u>Symptômes neurologiques</u>	<u>Symptômes musculaires</u>
Hexokinase	HK1	NM_000188	NON	NON
Glucose Phosphate isomerase	GPI	NM_000175	Possibles	NON
Phosphofructokinase	PFKM	NM_000289	NON	OUI
Aldolase	ALDOA	NM_000034	Possibles	Possibles
Triosephosphate isomerase	TPI1	NM_000365	OUI	NON
Adenylate kinase	AK1	NM_000476	NON	NON
Phosphoglycerate kinase	PGK1	NM_000291	OUI	OUI
Pyrimidine 5'-nucléotidase	NT5C3A	NM_001002010	NON	NON

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**

 Référence : **ANPGM\_137**  
 Page 26/31

 Numéro de version : **1**

## Annexe 4 : Gènes associés aux dysérythropoïèses congénitales (CDA)

<b>Protéine</b>	<b>Ref gène</b>	<b>NM</b>	<b>Maladie</b>
Chromosome 15 Open Reading Frame 41	C15ORF41	NM_001290233	CDA de type I (Orpha 98869)
Codanin-1	CDAN1	NM_138477	CDA de type I (Orpha 98869)
SEC23-Related Protein B	SEC23B	NM_001172745	CDA de type II (Orpha 98873)
Kinesin Family Member 23	KIF23	NM_138555	CDA de type III (Orpha 98870)
Kruppel like factor 1	KLF1	NM_006563	CDA de type IV (Orpha 293825)
GATA Binding Protein 1	GATA1	NM_002049	Anémie dysérythropoïétique congénitale avec thrombocytopénie (Orpha 67044)
Poly(ADP-ribose) polymérase 4	PARP4	NM_006437	CDA de type II (Orpha 98873)

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**

 Référence : **ANPGM\_137**  
 Page 27/31

Numéro de version : 1

## Annexe 5 : Gènes associés aux anémies sidéroblastiques constitutionnelles

<u>Maladie</u>	<u>Chromosome location</u>	<u>Ref gène</u>	<u>NM</u>	<u>Protéine défectueuse</u>
<b><u>Non syndromiques</u></b>				
Anémie sidéroblastique liée à l'X (Orpha 75563)	Xp11.21	<i>ALAS2</i>	NM_000032	5'-aminolevulinate synthase 2
Anémie sidéroblastique autosomique récessive de l'adulte (Orpha 255132)	14q32	<i>GLRX5</i>	NM_016417	Monothiol glutaredoxin-5
Anémie sidéroblastique autosomique récessive (Orpha 260305)	3p22.1	<i>SLC25A38</i>	NM_017875	Solute carrier family 25 member 38
<b><u>Syndromiques</u></b>				
Anémie sidéroblastique liée à l'X et ataxie spinocérébelleuse (Orpha 2802)	Xq13.3	<i>ABCB7</i>	NM_004299.5	ATP Binding Cassette Subfamily B Member 7
Myopathie mitochondriale et anémie sidéroblastique (Orpha 2598)	12q24.33	<i>PUS1</i>	NM_025215	Mitochondrial pseudouridine synthase 1
Myopathie mitochondriale et anémie sidéroblastique (Orpha 2598)	12p11.21	<i>YARS2</i>	NM_001040436	Mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase
Anémie mégalo-blastique thiamine-dépendante (Orpha 49827)	1q23.3	<i>SLC19A2</i>	NM_006996	Solute carrier family 19 member 2

## DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE

Référence : **ANPGM\_137**  
Page 28/31

Numéro de version : 1

## Références bibliographiques

1. Aguilar-Martinez P, Badens C, Bonello-Palot N, Cadet E, Couque N, Ducrocq R, et al. [Flowcharts for the diagnosis and the molecular characterization of hemoglobinopathies]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2010 Jul-Aug;68(4):455-64.
2. Farashi S, Harteveld CL. Molecular basis of alpha-thalassemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2018 May;70:43-53.
3. Thein SL. Molecular basis of beta thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis*. 2018 May;70:54-65.
4. Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sick cell disease. *Lancet*. 2017 Jul 15;390(10091):311-23.
5. Borg J, Georgitsi M, Aleporou-Marinou V, Kollia P, Patrinos GP. Genetic recombination as a major cause of mutagenesis in the human globin gene clusters. *Clin Biochem*. 2009 Dec;42(18):1839-50.
6. Pissard S, M'Rad A, Beuzard Y, Romeo PH. A new type of hereditary persistence of fetal haemoglobin (HPFH): HPFH Tunisia beta + (+C-200)G gamma. *Br J Haematol*. 1996 Oct;95(1):67-72.
7. Sankaran VG, Xu J, Byron R, Greisman HA, Fisher C, Weatherall DJ, et al. A functional element necessary for fetal hemoglobin silencing. *N Engl J Med*. 2011 Sep 1;365(9):807-14.
8. Chong SS, Boehm CD, Cutting GR, Higgs DR. Simplified multiplex-PCR diagnosis of common southeast asian deletional determinants of alpha-thalassemia. *Clin Chem*. 2000 Oct;46(10):1692-5.
9. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):360-2.
10. Soliman OE, Yahia S, Shouma A, Shafiek HK, Fouda AE, Azzam H, et al. Reverse hybridization StripAssay detection of beta-thalassemia mutations in northeast Egypt. *Hematology*. 2010 Jun;15(3):182-6.
11. Joly P, Lacan P, Garcia C, Couprie N, Francina A. Identification and molecular characterization of four new large deletions in the beta-globin gene cluster. *Blood Cells Mol Dis*. 2009 Jul-Aug;43(1):53-7.
12. Shang X, Peng Z, Ye Y, Asan, Zhang X, Chen Y, et al. Rapid Targeted Next-Generation Sequencing Platform for Molecular Screening and Clinical Genotyping in Subjects with Hemoglobinopathies. *EBioMedicine*. 2017 Sep;23:150-9.
13. Costa C, Pissard S, Girodon E, Huot D, Goossens M. A one-step real-time PCR assay for rapid prenatal diagnosis of sickle cell disease and detection of maternal contamination. *Mol Diagn*. 2003;7(1):45-8.
14. Mishra KK, Patel P, Bhukhanvala DS, Shah A, Ghosh K. A multiplex ARMS PCR approach to detection of common beta-globin gene mutations. *Anal Biochem*. 2017 Nov 15;537:93-8.
15. Danjou F, Francavilla M, Anni F, Satta S, Demartis FR, Perseu L, et al. A genetic score for the prediction of beta-thalassemia severity. *Haematologica*. 2015 Apr;100(4):452-7.
16. Roelens M, Dossier C, Fenneteau O, Couque N, Da Costa L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: the added value of cytology. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2016 Jun 1;74(3):299-305.
17. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*. 2008 Jan 5;371(9606):64-74.

## DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE

Référence : **ANPGM\_137**  
Page 29/31

Numéro de version : 1

18. Steiner M, Ludemann J, Krammer-Steiner B. Favism and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *N Engl J Med*. 2018 Mar 15;378(11):1068.
19. Grace RF, Zanella A, Neufeld EJ, Morton DH, Eber S, Yaish H, et al. Erythrocyte pyruvate kinase deficiency: 2015 status report. *Am J Hematol*. 2015 Sep;90(9):825-30.
20. Joly P, Lacan P, Garcia C, Martin C, Francina A. Rapid genotyping of two common G6PD variants, African (A-) and Mediterranean, by high-resolution melting analysis. *Clin Biochem*. 2009 Jan;43(1-2):193-7.
21. Kung C, Hixon J, Kosinski PA, Cianchetta G, Histen G, Chen Y, et al. AG-348 enhances pyruvate kinase activity in red blood cells from patients with pyruvate kinase deficiency. *Blood*. 2017 Sep 14;130(11):1347-56.
22. Badens C, Guizouarn H. Advances in understanding the pathogenesis of the red cell volume disorders. *Br J Haematol*. 2016 Sep;174(5):674-85.
23. Picard V, Guitton C, Thuret I, Rose C, Bendelac L, Ghazal K, et al. Clinical and biological features in PIEZO1-hereditary xerocytosis and Gardos-channelopathy: A retrospective series of 126 patients. *Haematologica*. 2019 Jan 17.
24. Cheli E, Roze J, Daouairi N, Racine J, Guy J, Ghazal K, et al. Value of combined spherocytose osmotic and EMA tests in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Int J Lab Hematol*. 2019 Feb 7.
25. Koralkova P, van Solinge WW, van Wijk R. Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia - pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis. *Int J Lab Hematol*. 2014 Jun;36(3):388-97.
26. Orvain C, Joly P, Pissard S, Badiou S, Badens C, Bonello-Palot N, et al. Diagnostic approach to hemoglobins with high oxygen affinity: experience from France and Belgium and review of the literature. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2017 Feb 1;75(1):39-51.
27. Iolascon A, Heimpel H, Wahlin A, Tamary H. Congenital dyserythropoietic anemias: molecular insights and diagnostic approach. *Blood*. 2013 Sep 26;122(13):2162-6.
28. Camaschella C. Hereditary sideroblastic anemias: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Semin Hematol*. 2009 Oct;46(4):371-7.
29. Camaschella C, Poggiali E. Inherited disorders of iron metabolism. *Curr Opin Pediatr*. 2011 Feb;23(1):14-20.

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**
Référence : **ANPGM\_137**Numéro de version : **1**

Page 30/31

## Groupe Diagnostique de la filière MCGRE

	Hémoglobino pathies alpha, bêta, gamma, delta (Sanger, gap-PCR, etc)	Déficits en G6PD/PK (Sanger)	Membranopathies du globule rouge (NGS)	Déficits enzymatiques du globule rouge (NGS)	Polyglobulies constitutionnelles hors hémoglobines hyper-affines (NGS)	Anémies dysérythropoï étiques congénitales (NGS)	Anémies sidéroblastiques et syndrome IRIDA (NGS)
<b>CHU de Guadeloupe</b> Dr Ketty Lee <a href="mailto:ketty.lee@chu-guadeloupe.fr">ketty.lee@chu-guadeloupe.fr</a>	X						
<b>CHU de Lille</b> Dr Patrice Maboudou <a href="mailto:patrice.maboudou@chru-lille.fr">patrice.maboudou@chru-lille.fr</a>	X						
<b>CHU d'Amiens</b> Pr Loic Garçon <a href="mailto:garcon.loic@chu-amiens.fr">garcon.loic@chu-amiens.fr</a> Dr Estelle Cadet <a href="mailto:estelle.cadet@u-picardie.fr">estelle.cadet@u-picardie.fr</a>	X	En cours de développement pour fin 2019					
<b>CHU de Rouen</b> Dr Agnès Lahary <a href="mailto:Agnes.Lahary@chu-rouen.fr">Agnes.Lahary@chu-rouen.fr</a>	Analyse phénotypiques uniquement						
<b>CHU Robert-Debré (AP-HP)</b> Pr Lydie Da Costa <a href="mailto:lydie.dacosta@rdb.aphp.fr">lydie.dacosta@rdb.aphp.fr</a> Dr Nathalie Couque <a href="mailto:nathalie.couque@rdb.aphp.fr">nathalie.couque@rdb.aphp.fr</a>	X	X	X	X		X	
<b>CHU Henri-Mondor (AP-HP)</b> Dr. Serge Pissard	X	X	X	X	X		

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PATHOLOGIES DU GLOBULE ROUGE**
Référence : **ANPGM\_137**Numéro de version : **1**

Page 31/31

<a href="mailto:serge.pissard@inserm.fr">serge.pissard@inserm.fr</a> Dr. Lamisse Mansour-Hendili <a href="mailto:lamisse.mansour-hendili@aphp.fr">lamisse.mansour-hendili@aphp.fr</a> Dr. Stéphane Moutereau <a href="mailto:stephane.moutereau@aphp.fr">stephane.moutereau@aphp.fr</a>							
<b>CHU Kremlin-Bicêtre (AP-HP)</b> Dr. Véronique Picard <a href="mailto:veronique.picard@bct.aphp.fr">veronique.picard@bct.aphp.fr</a>			X				
<b>CHU de Dijon</b> Pr François Girodon <a href="mailto:francois.girodon@chu-dijon.fr">francois.girodon@chu-dijon.fr</a>					X		
<b>CHU de Lyon (HCL)</b> Dr Philippe Joly <a href="mailto:philippe.joly@chu-lyon.fr">philippe.joly@chu-lyon.fr</a> Dr Céline Renoux <a href="mailto:celine.renoux@chu-lyon.fr">celine.renoux@chu-lyon.fr</a>	X	X	X	X			
<b>CHU de Montpellier</b> Pr Patricia Aguilar-Martinez <a href="mailto:p-martinez@chu-montpellier.fr">p-martinez@chu-montpellier.fr</a> Dr Muriel Giansily-Blaizot <a href="mailto:m-giansily@chu-montpellier.fr">m-giansily@chu-montpellier.fr</a>	X	X	X	X		X	X
<b>CHU de Marseille (AP-HM)</b> Pr Catherine Badens <a href="mailto:catherine.badens@univ-amu.fr">catherine.badens@univ-amu.fr</a> Dr Nathalie Bonello-Palot <a href="mailto:Nathalie.Bonello-Palot@mail.ap-hm.fr">Nathalie.Bonello-Palot@mail.ap-hm.fr</a>	X	G6PD uniquement	X	G6PD et PK uniquement			