



UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2024

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN MÉDECINE

**Évaluation de l'efficacité du ratio G6PD/PK dans le diagnostic
positif du déficit en G6PD chez la femme hétérozygote au CHU de
Lille**

Présentée et soutenue publiquement le 23 octobre à 14h
au Pôle Formation
par **TOUSSE Denys**

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Nicolas POTTIER

Assesseurs :

Monsieur le Docteur François LOISELEUR

Monsieur le Docteur Benjamin CARPENTIER

Directeur de thèse :

Monsieur le Docteur Patrice MABOUDOU

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses :
celles-ci sont propres à leurs auteurs.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	3
LISTE DES ABRÉVIATIONS	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
TABLE DES TABLEAUX	8
PARTIE 1 : GENERALITES SUR LA G6PD ET LA PK	11
I – DEFICIT EN G6PD	11
1) DEFINITION.....	11
2) ÉPIDEMIOLOGIE	12
3) GENETIQUE	15
4) PHYSIOPATHOLOGIE	22
5) CLINIQUE	25
6) DIAGNOSTIC.....	29
7) PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE.....	34
II – LE DEFICIT EN PYRUVATE KINASE	36
1) DEFINITION.....	36
2) ÉPIDEMIOLOGIE	38
3) GENETIQUE	39
4) STRUCTURE DE L'ENZYME	42
5) CLINIQUE	45
6) DIAGNOSTIC	48
7) THERAPEUTIQUE.....	50
PARTIE 2 : MÉTHODES DE DOSAGE :	52
I –LES METHODES DE DOSAGE ENZYMATIQUE	52
1) DOSAGE ENZYMATIQUE PAR SPECTROPHOTOMETRIE.....	52
2) LES TESTS RAPIDES DE FLUORESCENCES	54
3) DOSAGE ENZYMATIQUE DE REFERENCE POUR LA G6PD	56
4) DOSAGE ENZYMATIQUE DE REFERENCE POUR LA PK.....	56
5) AVANTAGE ET INCONVENIENT DES DOSAGES ENZYMATIQUES.....	57
II -LES TESTS CYTOFLUOROMETRIQUES :	58
1) DESCRIPTION DES TECHNIQUES CYTOCHIMIQUES.....	58

2) DESCRIPTION GENERALE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX.	61
3) DESCRIPTION DES TECHNIQUES CYTOFLUOROMETRIQUES ACTUELLES :	62
III- SEQUENÇAGE DU GENOME.....	65
1) TECHNIQUE SANGER	65
2) NEW GENERATION SEQUENCING	67
PARTIE 3 : COMPARAISON ENTRE L'ACTIVITE G6PD ET LE RATIO G6PD/PK AVEC POUR REFERENCE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE	69
I-OBJECTIF DE THESE.....	69
II-MATERIEL ET METHODES	71
III-RESULTATS	73
1) DISTRIBUTION DES VARIABLES	73
2) COMPARAISON DES MESURES	75
3) COMPARAISON A LA BM	75
4) MESURE DES PERFORMANCES DIAGNOSTIQUES	78
5) TEST DE COMPARAISON DES AUC	79
IV-DISCUSSION :	80
1) ANALYSE DES RESULTATS	80
2) PRINCIPALES LIMITES DE L'ETUDE	81
3) PERSPECTIVES D'AVENIR	86
CONCLUSION :.....	87
BIBLIOGRAPHIE.....	89

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-3DPG	Acide 2,3-bisphosphoglycérique
ACD	Acide Citrate Dextrose
ACMG	American College of Genetic and Genomique
ATP	Adénosine Triphosphate
AUC	Aire sous la Courbe
CMF	Cytométrie en Flux
CNSHA	Anémie Chronique Hémolytique Non Sphérocytaire
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
DDNTP	Didésoxyribonucléotide
DNTP	Désoxynucléotide triphosphate
DO	Densité Optique
EDTA	Acide Éthylène Diamine tétra acétique
G6P	Glucose 6 Phosphate
G6PD	Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase
GVH	Maladie du Greffon
H2O2	Peroxyde d'Hydrogène
HAS	Haute Autorité de Santé
Hb	Hémoglobine
HGMD	Human Genome Mutation Database
HPN	Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne
ISCH	International Committee for Standardization of Hematology
KCN	Cyanure de Potassium
LDH	Lactate Déshydrogénase
MetHb	Méthémoglobine
NAC	N-acétylcystéine
NADP	Nicotamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NADPH	Nicotamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène
NFS	Numération Formule Sanguine

NGS	New Génération Sequencing
OMS	Organisation Mondial de Santé
OxyHb	Oxyhémoglobine
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase
PEP	Phosphoénolpyruvate
PK	Pyruvate Kinase
ROC	Receiver Operating Characteristics
TDA	Test Direct à l'Anti-globuline
UV	Ultra-Violet
VAF	Fréquence de Variation Allélique
VSI	Variant de Signification Inconnu

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Cycle enzymatique et mécanisme d'action anti oxydante de la G6PD (5) .	11
Figure 2 : Représentation du gène G6PD avec certains variants connus et les exons incriminés (12).	15
Figure 3: Classification des variants en G6PD sur les recommandations de l'OMS datant de 1989(45).	21
Figure 4: Structure de la G6PD sur un modèle en 3 dimensions (52) .	24
Figure 5: Attitude diagnostique d'un déficit en G6PD en cas de suspicion de déficit en Italie (36) .	33
Figure 6 : Cycle enzymatique de la pyruvate kinase. (84) .	36
Figure 7 : Gène PK-LR et ses différents exons.(88) .	40
Figure 8 : Structure tridimensionnelle de la PKR. (93).	43
Figure 9 : Représentation des symptômes et complications du déficit en PK(88) .	47
Figure 10 : Arbre diagnostique du déficit en PK et éventuel diagnostic différentiel (67) .	49
Figure 11: Structure et principe de base d'un spectrophotomètre(96) .	52
Figure 12: Résultat du test de fluorescence spot pour le déficit en G6PD (98) .	55
Figure 13: Principe de la réaction enzymatique du G6PD .	56
Figure 14 : Principe de la réaction enzymatique du PK .	56
Figure 15 : Test d'élution de méthémoglobine. (102) .	59
Figure 16 : Test de réduction de sel tétrazolium. (73).	60
Figure 17: Représentation schématique d'un cytomètre de Flux(102).	61
Figure 18 : Analyse par Cytométrie en flux du déficit en G6PD par technique cytochimique fondée sur la formation de formazan. (73) .	63
Figure 19 : Détection de variant du G6PD par technique Sanger.(104).	66
Figure 20 : Différentes étapes du NGS par technique Illumina(106).	67
Figure 21: Diagramme de flux.	71
Figure 22 : Histogramme en bar vérifiant les distributions de l'activité et du ratio G6PD/PK.	73
Figure 23 : Box Plot vérifiant les distributions de l'activité et du ratio G6PD/PK.	74
Figure 24 : Corrélation de Pearson entre l'activité et le ratio G6PD/PK.	75
Figure 25 : Comparaison des groupes absence et présence de déficit en fonction de l'activité G6PD.	76
Figure 26 : Comparaison des groupes absence et présence de déficit en fonction du ratio G6PD/PK.	77
Figure 27 : Analyse ROC des résultats pour l'activité G6PD .	78
Figure 28 : Analyse ROC des résultats pour le ratio G6PD/PK .	79
Figure 29 : Représentation de l'activité G6PD en fonction de la catégorie d'âge .	84
Figure 30 : Représentation du ratio G6PD/PK en fonction des catégories d'âge .	85

Table des tableaux

Tableau 1: Liste des variants les plus fréquents avec leur distribution géographique (45)	19
Tableau 2: Liste des traitements à éviter en cas de déficit en G6PD (16)	25
Tableau 3: Mutations les plus communes du gène PKLR et sa distribution ethnique et allélique (91)	41

INTRODUCTION

Les anémies hémolytiques sont un ensemble de pathologies de diverses origines comme les pathologies du globule rouge qui résultent d'une augmentation du taux de destruction des globules rouges (1). Ces pathologies ont pour particularité une transmission essentiellement d'origine héréditaire (2–5). En effet, il a été retrouvé des altérations génétiquement déterminées dans les protéines de membranes et celles responsables de la catalyse érythrocytaire (3).

Parmi ces pathologies héréditaires figurent les hémoglobinopathies avec la présence d'un variant inné de l'hémoglobine anormale pouvant être à l'origine des thalassémies et du syndrome drépanocytaire (6). Des anomalies au niveau de la membrane sont également identifiées comme la sphérocytose héréditaire, l'elliptocytose familiale et bien évidemment les enzymopathies (7).

Concernant plus précisément les déficits enzymatiques, ils présentent une très grande diversité sur le plan clinique en raison de leur grande variabilité sur le plan moléculaire (2–5).

La découverte de ces déficits enzymatiques date des années 1950 par Selwyn et Dacie qui décèlent le phénomène d'hémolyse intra érythrocytaire chez les patients atteints d'anémie chronique hémolytique non sphérocytaire (CNSHA) (4).

Physiologiquement, les globules rouges ou érythrocytes possèdent un métabolisme dépourvu de synthèse protéique, lipidique et de mécanisme de phosphorylation. Cela explique que les déficits enzymatiques ont un effet accru lié à l'absence de mécanisme de compensation au phénomène de glycolyse chez l'érythrocyte(4).

La glycolyse correspond au catabolisme du glucose plasmatique par le biais d'une cascade réactionnelle en chaîne entraînant la production d'énergie sous forme de phosphate appelé adénosine triphosphate (ATP) et d'autres équivalents réducteurs sous forme glutathion (GSH) (4).

Parmi les déficits enzymatiques se distinguent 2 grosses entités, le déficit en Glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PD) et le déficit en Pyruvate Kinase (PK)(5).

Ces 2 déficits enzymatiques sont bien décrits dans la littérature avec des tests efficaces et robustes pour les diagnostiquer. Toutefois il reste une difficulté majeure de diagnostic chez les femmes déficitaires hétérozygotes en G6PD avec un risque de sous-évaluation diagnostique (8). Pour y pallier, un ratio a été mis en place fondé sur les données de la littérature prenant en compte le taux d'activité en G6PD et en PK (9).

L'objectif de ce travail est d'évaluer la pertinence de ce ratio chez la femme en le mettant en lien avec le génotypage de la G6PD.

PARTIE 1 : Généralités sur la G6PD et la PK

I – Déficit en G6PD

1) Définition

La G6PD est une enzyme jouant un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire par une action anti oxydante (10–21).

Elle permet la transformation de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène) à partir de la NADP (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) en utilisant le système de pentose phosphate correspondant à la voie alterne du système de la glycolyse (10–21).

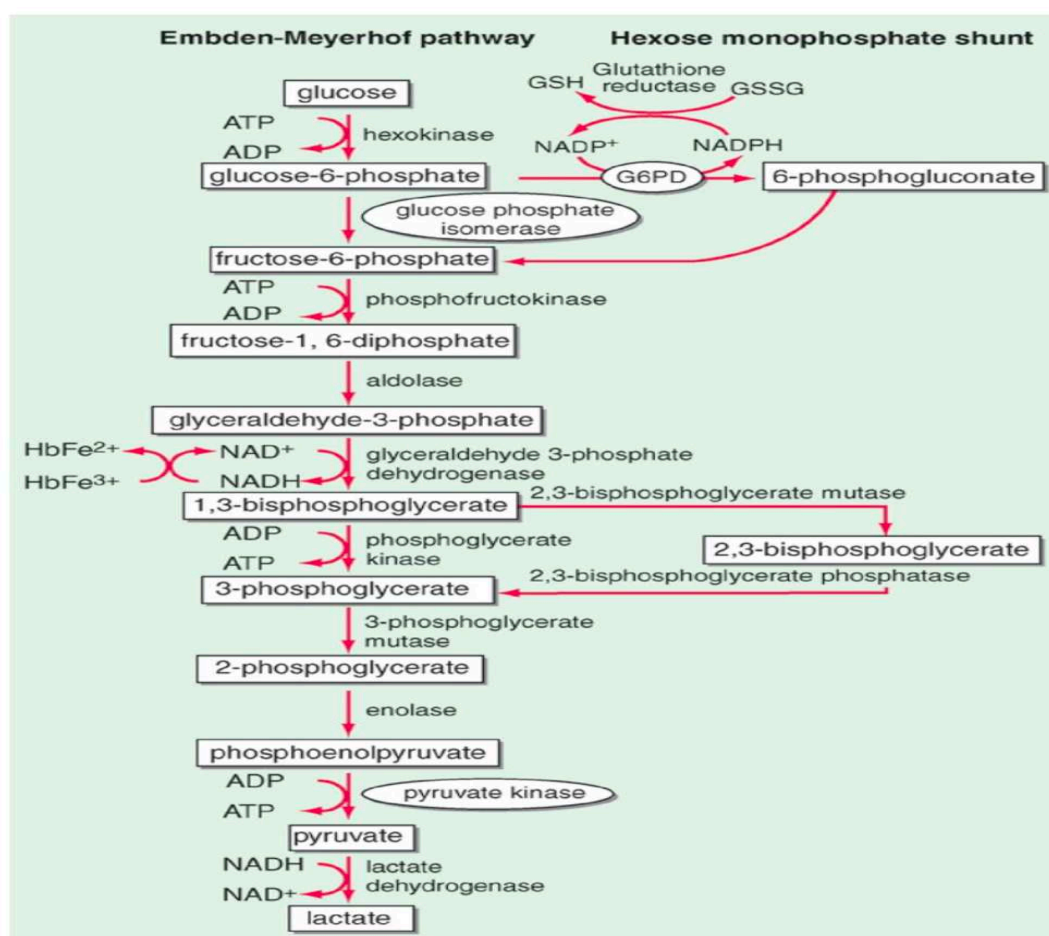


Figure 1 : Cycle enzymatique et mécanisme d'action anti oxydante de la G6PD (5). La G6PD produit la NADPH qui permet la conversion du glutathion sous sa forme réduite et stabilise la structure de la catalase. Ceci permet à la cellule de se défendre contre tout stress oxydant.

La NADPH produite permet le maintien du glutathion sous forme réduite afin de lutter contre le stress oxydatif subi par les érythrocytes. Un niveau élevé de stress oxydatif entraîne une perte d'intégrité membranaire conduisant à l'hémolyse des globules rouges(10).

Or dans le cas d'une hémolyse, les cellules n'arrivent pas à produire suffisamment de NADPH via la G6PD pour lutter contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène. Comme la G6PD est la génératrice exclusive de NADPH pour les cellules matures, celle-ci est indispensable pour éviter les anémies sévères(10).

De ce fait, l'activité enzymatique en G6PD est donc indispensable au bon fonctionnement érythrocytaire(10).

2) Épidémiologie

Le déficit en G6PD représente le déficit héréditaire enzymatique le plus fréquent du globule rouge (11–13,15). Son mode de transmission est récessif lié à l'X donc d'origine maternelle (13,15,22,23).

A la fin du XIXème, le déficit en G6PD était surnommé favisme en raison de l'apparition des symptômes à la suite de l'ingestion de fèves (24).

Le premier diagnostic formel d'un déficit en G6PD a été établi par Carson et ses collaborateurs qui ont mis en évidence une diminution de l'activité enzymatique de la G6PD lors d'une hémolyse intra érythrocytaire (11,12,25).

Actuellement, environ 500 millions de personnes sont atteintes du déficit dans le monde, ce qui correspond à une prévalence estimée à 6,2% sur une population

totale évaluée à 8 milliards (26–28). La mortalité dans la population mondiale serait d'environ 410 personnes par an selon une étude publiée par le Lancet réalisée durant la période de 1999 à 2013 (29).

Ce déficit présente des prévalences très hétérogènes dans la population mondiale que l'on retrouve également à l'échelle d'un même pays, comme en Arabie Saoudite, où la prévalence est évaluée à 32% à Al Qatif contre seulement 3% à Riyad, ce qui explique que même dans des régions géographiques circonscrites, le risque est extrêmement variable (30).

Un lien particulier avec les zones endémiques du paludisme est souvent retrouvé. En effet, on peut constater que les patients ayant un variant déficitaire en G6PD présentent pour la plupart une résistance vis-à-vis du paludisme (31). Cette résistance est retrouvée chez les hommes hémizygotes mais également chez les femmes hétérozygotes, ce qui laisse supposer que le déficit en G6PD est un mécanisme d'adaptation vis-à-vis du risque d'un parasitisme érythrocytaire (31). Chez le patient déficitaire en G6PD, les érythrocytes sont exposés à un nombre d'agents oxydants plus important ce qui complique l'infestation dans ces cellules car le parasite est très sensible aux agents oxydants (31). De plus dans les zones endémiques, la prévalence s'élève autour d'une moyenne de 8% (30,32).

Les populations les plus touchées correspondent notamment aux sujets Africains, Afro-américains, Asiatiques, Méditerranéens et d'Amérique Latine. L'Asie avec particulièrement sa partie sud ainsi que la péninsule arabique concentre le plus de cas recensés en raison de leur forte densité de population (32).

L'incidence de découverte, quant à elle, selon diverses études représenterait de 2% à 20%, dans le pourtour du bassin méditerranéen, en Asie du Sud-est et en Afrique

subsaharienne(9). En Italie, les fréquences varient de 0,2% à 4,4% avec une tendance plus importante dans le nord de l'Italie(33). En Sardaigne, elle représente même 10% de la population(9,33).

Dans les autres pays européens, la fréquence serait bien moins importante(34).

Aux États Unis, dans des études fondées seulement sur la population Afro-américaine, 10% de cette population serait atteinte(34,35).

3) Génétique

Le gène de la G6PD a une taille d'environ 20 kb (kilobase) et est composé de 13 exons et 12 introns(36). Il est constitué de 2622 nucléotides avec 12 exons codants(11). L'exon 1 est considéré comme non codant c'est-à-dire qu'il n'intervient pas dans la transcription du génome(36).

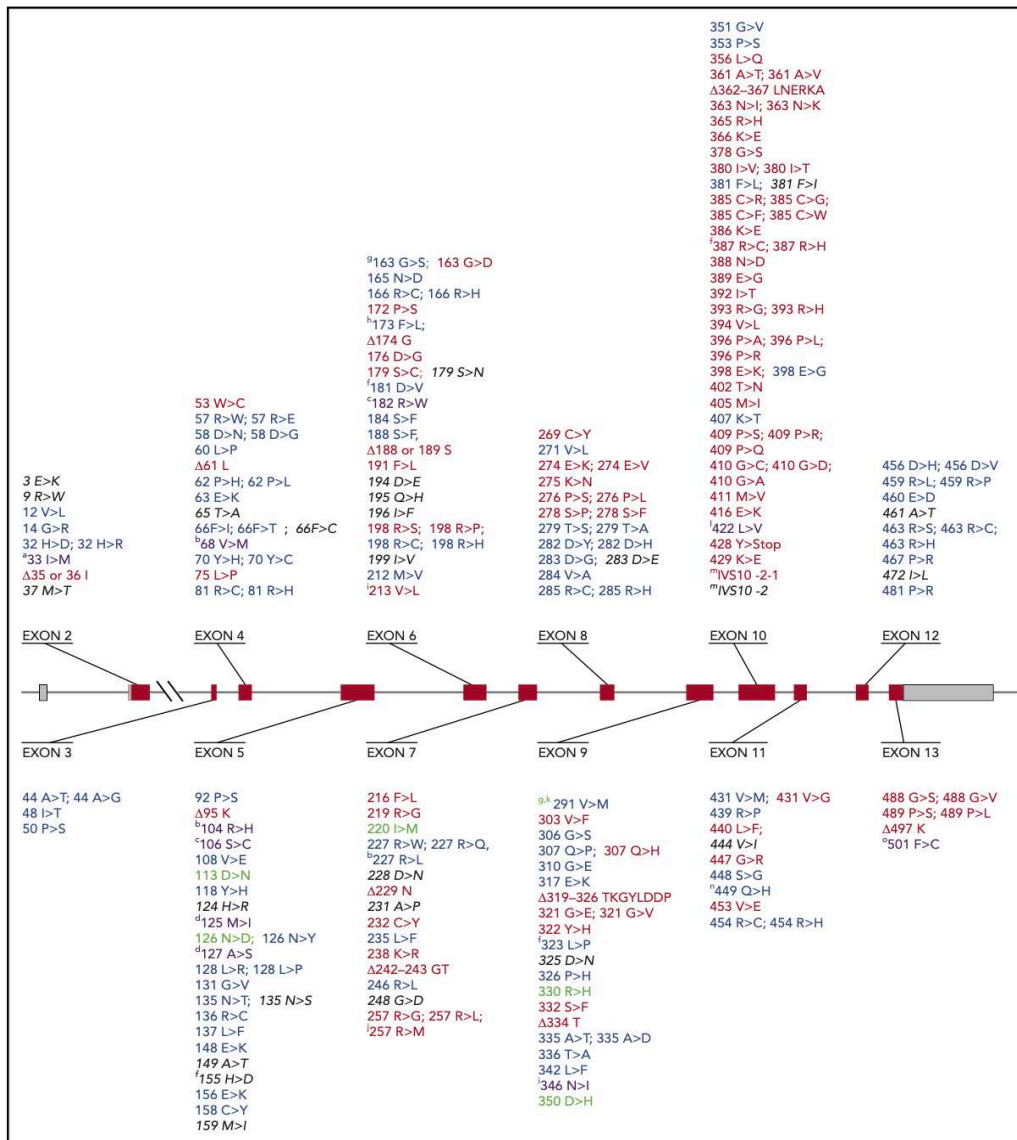


Figure 2 : Représentation du gène G6PD avec certains variants connus et les exons incriminés (12).
L'exon 1 et une partie de l'exon 13 sont illustrés en gris car n'intervenant pas dans la transcription du génome.

Son promoteur est composé d'un ensemble riche en GC (Guanine et Cytosine). Le gène est situé dans la région distale du bras long du chromosome X en position Xq28 où l'on retrouve également le gène impliqué dans l'hémophilie A(35).

L'atteinte est majoritairement hémizygote car plus fréquemment retrouvée chez l'homme porteur d'un seul chromosome X(37). Chez la femme, des atteintes homozygotes existent avec altération des 2 chromosomes X touchés. Bien que la transmission soit récessive liée à X, un phénomène d'inactivation d'un des 2 chromosomes X a été décrit justifiant aussi la possibilité d'une atteinte hétérozygote chez la femme(25). En effet, parmi les différentes cellules de la lignée du globule rouge, chacune d'elles n'exprime qu'un seul allèle des 2 chromosomes X, l'autre est inactif. Ce phénomène est appelé la lyonisation(26). Cela donne une double population cellulaire avec une partie des érythrocytes non déficients et l'autre déficients. L'épissage se réalise de manière aléatoire durant la phase embryonnaire avec peu de cellules. Par conséquent, même si le ratio cellule déficiente/non déficiente est à 50% durant cette étape, la distribution finale peut être très variable selon la sélection cellulaire finale passant d'un phénotype normal avec une grande majorité d'érythrocytes normaux à un phénotype extrême mimant un homozygote(25,38). Cela explique pourquoi chez les femmes hétérozygotes, le phénotype est très variable.

Il a été démontré que les atteintes situées au niveau de la zone au contact de la NADP structurelle et de l'interface dimérique sont à l'origine des déficits sévères car ils affectent principalement la stabilité de la molécule(39).

Plus de 400 variants différents ont été décrits, parmi lesquels 286 ont été classés

selon les critères ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) et 186 restent à ce jour classés comme VSI (variant de signification indéterminée) ou non classés(27).

Cela induit un grand polymorphisme des atteintes. Ces variants polymorphes entraînent dans la plupart des cas, une réduction de l'activité enzymatique et sont souvent signalés avec une stabilité enzymatique réduite ainsi que des perturbations dans le repliement des protéines(12).

Toutefois, la plupart des atteintes correspondent à une modification d'un seul acide aminé provenant d'une simple substitution d'un seul ou de deux nucléotides(12,40).

Mais une faible minorité de variants se rapportent soit à une délétion de quelques acides aminés d'un exon, soit à des délétions retrouvées dans l'intron au niveau du site d'épissage ou parfois à des substitutions de 3 nucléotides(40). En l'état actuel des connaissances, aucun variant n'a été retrouvé chez l'être humain à l'origine d'une perte complète de l'enzyme, probablement parce qu'un variant ayant ces caractéristiques serait non compatible avec la vie. Cela semble prouver que la G6PD est indispensable à la vie(37).

Certains variants appelés polymorphes peuvent représenter jusqu'à 70 % des variants détectés dans des populations particulières. Selon les zones géographiques, un diagnostic ciblé d'un variant spécifique par PCR peut être utile(36). Cela permet de simplifier la prise en charge thérapeutique et lutter efficacement contre la morbidité associée au déficit en G6PD(37).

Les variant A- et méditerranéen sont d'ailleurs les variants les plus fréquemment

retrouvés dans le monde. Le variant méditerranéen (Ser188Phe) fait partie des premiers variants décrits dans la littérature. Il est beaucoup plus répandu comme son nom l'indique dans les zones méditerranéennes (Espagne, Italie, Grèce), au Moyen-Orient mais aussi dans le sous-continent indien. Le variant A- (Val 68 Met + Asn 128 Asp) représente la grande majorité des déficits en G6PD en Afrique(11,41–43). Il provient d'une mutation ponctuelle dans le gène A du variant non déficient G6PD A (Asn126Asp)(41).

En Chine, un certain nombre de variants polymorphes sont présents, chacun avec une distribution unique dans tout le pays. Certains variants polymorphes comme G6PD Namoru sont circonscrits à de petites populations telles que les groupes tribaux indiens du district du Nilgiri tandis que d'autres dont G6PD Union et G6PD Chatham ont une distribution beaucoup plus large(44).

Outre l'origine héréditaire du déficit dans certains cas, il peut survenir des mutations sporadiques de novo c'est-à-dire l'apparition d'un variant sans lien familial établi. Cela reste bien évidemment beaucoup plus rare et souvent avec des conséquences cliniques plus graves que les variants polymorphes(13).

Variant name	Synonyms ^a	cDNA nucleotide substitution	Amino acid substitution	Geographic distribution ^b
Orissa		131 C → G	44 Ala → Gly	Bangladesh, China, India , Mauritius, Pakistan, Singapore
Aures		143 T → C	48 Ile → Thr	Algeria, Kuwait, Saudi Arabia , Spain, UAE
A ⁻	Betica, Alabama, Kabyle, Laghouat, Tépéc, Castilla, Matera, Ferrara, Distrito Federal	202 G → A 376 A → G	68 Val → Met 126 Asn → Asp	All African countries, Brazil , France, Haiti, Honduras, Iraq, Italy, Jordan, Kuwait, Mexico, Portugal, Principe, Sao Tome, Saudi Arabia, Spain, UAE, USA, Venezuela
Vanua Lava		383 T → C	128 Leu → Pro	Indonesia, Malaysia, Mexico, Philippines, Vanuatu
Cairo		404 A → C	135 Asn → Thr	Egypt, Palestine
Mahidol		487 G → A	163 Gly → Ser	Bangladesh, Cambodia, China , Laos, Myanmar , Singapore, Thailand
Mediterranean	Dallas, Birmingham, Sassari, Cagliari, Panama	563 C → T	188 Ser → Phe	Afghanistan , Algeria, Brazil, Bulgaria, Cambodia, Comoros, Croatia, Cyprus , Egypt, France Greece , Indonesia, Iran , Iraq , Italy, Jordan , Kuwait , Macedonia, Malaysia , Mauritania, Mauritius, Myanmar, Oman , Pakistan , Portugal, Saudi Arabia , Singapore, Spain, Syria, Tunisia, UAE, Venezuela
Coimbra	Shunde	592 C → T	198 Arg → Cys	Cambodia, India, Indonesia, Italy, Malaysia, Portugal
Seattle	Mexico, Athens-like, Ferrara II, Modena, Lodi	844 G → C	282 Asp → His	Algeria, Brazil, Bulgaria, Canary Islands, Croatia, France, Greece, Indonesia, Italy, Mauritius, Mexico, Myanmar, Portugal, Spain, Thailand, USA
Viangchan	Jammu	871 G → A	291 Val → Met	Cambodia , China, Indonesia, Laos , Malaysia , Myanmar, Thailand , Vietnam
Kalyan, Kerala	Jamnagar, Rohini	949 G → A	317 Glu → Lys	Bangladesh, India, Mauritius
A ⁻	Betica, Selma, Guantanamo	968 T → C 376 A → G	323 Leu → Pro 126 Asn → Asp	All African countries, Brazil , France, Haiti, Honduras, Iraq, Italy, Jordan, Kuwait, Mexico, Portugal, Principe, Sao Tome, Saudi Arabia, Spain, UAE, USA, Venezuela
Chatham		1003 G → A	335 Ala → Thr	Algeria, India, Indonesia, Iran, Iraq, Italy, Jordan, Kuwait, Oman, Pakistan, Spain
Union	Kalo, Chinese-2, Maewo	1360 C → T	454 Arg → Cys	Cambodia, Croatia, Italy, Laos, Mauritius, Mexico, Myanmar, Spain, Thailand, Vanuatu , Vietnam
Cosenza		1376 G → C	459 Arg → Pro	Croatia, Iran, Italy
Canton	Taiwan-Hakka, Gifu-like, Agrigento-like	1376 G → T	459 Arg → Leu	Cambodia, China , Myanmar, Singapore , Thailand , Vietnam
Kaiping	Wosera, Sapporo-like, Petrich, Petrich-like, Anant, Dhon	1388 G → A	463 Arg → His	China , Indonesia , Laos, Myanmar, Singapore, Thailand , Vietnam

Tableau 1 : Liste des variants les plus fréquents avec leur distribution géographique (45)

Les variants sont distingués en 5 catégories fondées sur des critères de mesure de l'activité de l'enzyme et des manifestations cliniques en corrélation avec la classification de l'OMS(45).

La classe 1 correspond à la forme la plus sévère et également la plus rare. Elle est toujours associée avec ce que l'on appelle le CNSHA (anémie chronique hémolytique non-sphérocytaire)(27).

Le taux d'activité de l'enzyme est décrit comme au minimum inférieur à 10% et souvent inférieur à 1%.

Il semblerait que les atteintes sévères se retrouveraient majoritairement au sein des exons 10 et 11(11). Ces exons seraient responsables des interactions hydrophobes avec la NADP, essentielles au fonctionnement et à la stabilité de l'enzyme(31,46).

Pour les autres classes avec des atteintes moins sévères, les différents variants seraient situés partout dans le génome sans hot spot caractérisé(11).

Les variants de classe 2 correspondant à moins de 10 % d'activité et ceux de la classe 3 entre 10 et 60 % d'activité représentent les 2 classes déficitaires les plus fréquentes(45). Elles ne sont pas forcément toujours séparées en raison de leur manifestation clinique très proche(27,28).

Quant aux variants de classe 4 qui possèdent une activité normale et de classe 5 une activité augmentée, ils ont des manifestations cliniques exceptionnelles. Leur diagnostic n'est que très rarement fait(45).

Class ^b	No. of polymorphic	Electrophoretic mobility			% with electrophoretic change	Total
		Fast	Normal	Slow		
I	1 (1) ^c	20	30	32	63	82
II	49 (45)	29	39	41	64	109
III	22 (30)	25	13	36	82	74
IV	14 (32)	15	2	26	95	43
V	—	2	—	—	100	2
Total	86 (28)	91	84	135	73	310

^a Source: reference 2

^b Class I —associated with chronic non-spherocytic haemolytic anaemia (CNSHA).

Class II —severely deficient: less than 10% residual activity.

Class III—moderately deficient: 10–60% residual activity.

Class IV—normal activity: 60–150%.

Class V —increased activity.

Figure 3: Classification des variants en G6PD sur les recommandations de l'OMS datant de 1989(45)

Une nouvelle classification de l'OMS est d'ailleurs en cours d'approbation pour laquelle on ne distinguerait plus que 2 classes avec une classe A pour les formes sévères et chroniques et une classe B regroupant les autres formes clinico-biologiques(47).

4) Physiopathologie

La G6PD est une protéine qui interagit étroitement avec la NADP(48–50).

Elle est présente dans l'organisme sous une association de formes polymériques distinctes. En effet on retrouve des formes tétramériques (composées de 4 sous-unités), dimériques (composées de 2 sous-unités) dans l'organisme en équilibre.(48–50). Chaque sous-unité est constituée en moyenne de 515 acides aminés(11). Une sous-unité est constituée de 2 parties appelées domaines(48).

On distingue :

- le domaine N-terminal ou (amino-terminal) correspondant à la partie proximale. Il possède un repliement type « dinucleotide binding-fole » spécifique des enzymes liant la NADP + ou NADPH(48,49). On y retrouve notamment le site de liaison à la coenzyme NADP+.

- le domaine C-terminal ou (carboxyl-terminal) est la partie finale de l'enzyme et correspond au domaine le plus grand dont le rôle principal est de reconnaître et permettre la liaison avec le substrat G6P(51). Il permet également l'association des monomères et leur stabilisation sous forme de dimère(48).

Un modèle sous forme cristalloïde a été décrit dans la littérature reposant essentiellement sur l'association G6PD et NADP+(51).

La distinction entre ces formes serait liée au taux d'acidité du pH, à des interactions électrostatiques ainsi qu'aux forces ioniques(49). Que ce soit sous forme dimérique

ou tétramérique, la protéine est active. D'ailleurs sur le plan physiologique, la signification du changement de forme reste inconnue(50).

La forme tétramérique est plus petite avec des interactions purement électrostatiques tandis que la forme dimérique, la plus présente chez l'homme correspondrait à une des formes actives de l'enzyme, composée de 2 sous-unités qui s'associent entre elles pour permettre une meilleure stabilité(49).

Parmi les éléments essentiels au fonctionnement enzymatique est retrouvé un site de liaison catalytique présent dans chaque monomère garantissant la liaison entre le substrat de la G6PD et la coenzyme de la NADP ⁺(49).

Le site de liaison catalytique est facilité par la présence d'un résidu Proline en position 172, existant dans chaque sous-unité du dimère qui participe à la conformation de la G6PD(49). En présence du substrat et de la coenzyme, on constate un changement de position de l'hélice de la forme trans à la forme cis, indispensable pour assurer les interactions G6PD et NADP ⁺(49). Ce changement permet à un résidu Lysine en position 171 d'interagir plus facilement avec le substrat G6P et la coenzyme NADP⁺ pour déclencher la réaction enzymatique avec la transformation du Glucose 6 phosphate en 6-phosphogluconate(49).

Une autre interaction importante est la zone de contact entre les 2 sous-unités, située 15 acides aminés plus loin en aval du site de liaison catalytique. Pour lequel une autre molécule de NADP⁺ jouerait un rôle de stabilisateur indispensable pour maintenir l'enzyme sous sa forme active(50).

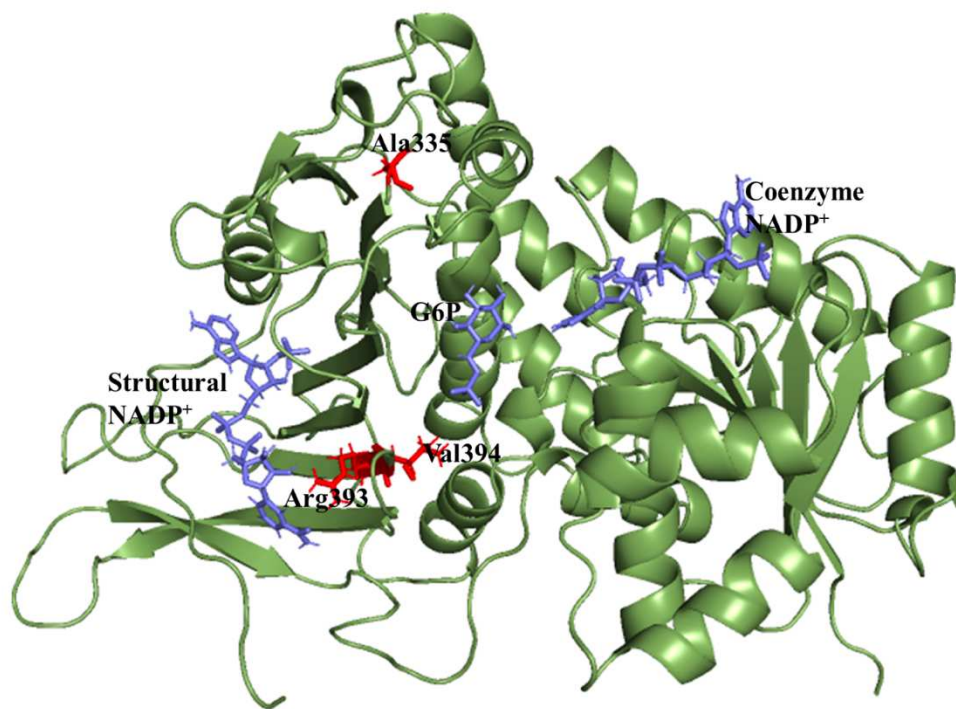


Figure 4: Structure de la G6PD sur un modèle en 3 dimensions. (52). On retrouve les différents sites de liaison avec la liaison au substrat, à la coenzyme et la zone de liaison des dimères en bleu.

5) Clinique

Sur le plan clinique, il n'existe pas de signes pathognomoniques d'un déficit en G6PD car ceux-ci peuvent être retrouvés dans d'autres pathologies du globule rouge. Par ailleurs, dans la majorité des cas, en l'absence d'élément déclencheur, l'atteinte est asymptomatique(37).

Le tableau clinique typique correspond à un sujet masculin d'origine méditerranéenne plutôt bien portant de base avec l'apparition brutale d'une hémolyse c'est-à-dire une destruction plus précoce des globules rouges et d'une hémoglobinurie (urine rouge porto) après l'exposition à un stress oxydatif ou à un médicament déclencheur(22).

<i>Drug name</i>	<i>Use</i>
Dapsone	Antimicrobial for treatment of leprosy
Flutamide (Eulexin)	Antiandrogen for treatment of prostate cancer
Mafenide cream (Sulfamylon)	Topical antimicrobial
Methylene blue (Urolene Blue)	Antidote for drug-induced methemoglobinemia
Nalidixic acid (NegGram)	Antibiotic used primarily for urinary tract infections
Nitrofurantoin (Macrochantin)	Antibiotic used primarily for urinary tract infections
Phenazopyridine (Pyridium)	Analgesic for treatment of dysuria
Primaquine	Antimalaria agent
Rasburicase (Elitek)	Adjunct to antineoplastic agents
Sulfacetamide (Klaron)	Antibiotic (ophthalmic and topical preparations)
Sulfamethoxazole (Gantanol)	Antibiotic used in combination preparations (i.e., trimethoprim-sulfamethoxazole [TMP-SMX; Bactrim, Septra])
Sulfanilamide (AVC)	Antifungal agent for treatment of vulvovaginal <i>Candida albicans</i> infection

G6PD = glucose-6-phosphate dehydrogenase.

**—Classes I, II, and III.*

Information from reference 6.

Tableau 2: Liste des traitements à éviter en cas de déficit en G6PD (16)

Parmi les traitements ci-dessus, la dapsons et la primaquine sont les déclencheurs les plus cités dans la littérature(38).

Un autre facteur de déclenchement d'une crise hémolytique est le syndrome infectieux sévère. De nombreux virus ou bactéries responsables sont envisageables par exemple des infections par streptococcus, cytomégalovirus, le virus de la dengue, brucella, rickettsies et même les différents types d'hépatites A, E...(11,37).

Cependant, le mécanisme expliquant l'implication de l'infection virale ou bactérienne reste encore à élucider. Il semblerait que ce soit durant la phagocytose des leucocytes qu'il y aurait une génération d'agents oxydants déclenchant le phénomène d'hémolyse(16).

Dans ce cadre, on retrouve classiquement une anémie transitoire avec des taux très variables allant de 2,0 mg/dl à 12,0 mg/dl et une augmentation des réticulocytes en faveur d'une activité médullaire accrue pour lutter contre l'hémolyse (52). Sur le plan biologique, l'élévation des LDH, de la bilirubine et l'effondrement de l'haptoglobine sont observés(16). Lorsque le frottis sanguin est réalisé, la présence de corps de Heinz est évocatrice mais peu recherchée en pratique(40).

Les signes cliniques fréquemment observés sont la splénomégalie, l'hépatomégalie, l'ictère, la présence d'urines rouge porto, la tachycardie, la pâleur et accompagnés parfois de signes inconstants comme des malaises, nausées, douleurs abdominales et vomissements(16).

Ces différents symptômes apparaissent dans les 24 à 72 heures après l'exposition avec une résolution dans les 4 à 7 jours(16).

Chez le nouveau né, est observé une hyperbilirubinémie néonatale, touchant environ 5 % des nourrissons déficients en G6PD(53). C'est un phénomène physiologique fréquent chez le nouveau-né s'expliquant par la production de bilirubine provenant de

la destruction des érythrocytes. Leur durée de vie est raccourcie chez l'enfant et la capacité d'élimination est diminuée, ce qui se traduit par l'apparition d'un ictère néonatal, également appelé jaunisse en référence à la coloration jaunâtre de la peau, des scléreuses et des muqueuses en raison de l'accumulation de bilirubine dans les tissus(54). Ce phénomène survient dans les 24 à 48 heures suivant la naissance. Une élévation retardée de la bilirubine indirecte est visible entre le 3e et le 5e jour après la naissance, avec des concentrations de bilirubine directe dans les normes pour l'âge(55).

La présence du déficit entraîne généralement une atteinte plus sévère en raison d'une concentration de bilirubine plus élevée par rapport à la population générale(53,55–57).

En effet, 1/4 à 1/3 des hyperbilirubinémies sévères des nouveaux nés seraient associées à un déficit en G6PD(45).

L'augmentation rapide et importante du taux de bilirubine dans le sang présente un risque potentiellement neurotoxique, notamment avec une atteinte spécifique des noyaux gris centraux et du centre auditif. Les conséquences peuvent inclure des séquelles graves telles qu'une atteinte motrice avec des troubles de coordination des mouvements, une paralysie du regard et une surdité centrale(58).

Dans les cas graves, on parle d'ictère nucléaire avec une concentration de bilirubine excédant les 300 $\mu\text{mol/L}$ pouvant entraîner le décès s'il est pris en charge trop tardivement. Cela nécessite une hospitalisation avec un traitement par photothérapie et d'une transfusion sanguine par échange(59).

Le couplage avec la mutation du gène *UGT1A1* responsable de la maladie de Gilbert qui correspond à une augmentation du taux de bilirubine conjugué est un autre facteur augmentant fortement la possibilité d'un ictère néonatal(59).

Une autre atteinte appelée l'anémie chronique hémolytique de cause non sphérocytaire est quant à elle retrouvée uniquement chez les patients présentant les variants les plus sévères de G6PD avec une activité enzymatique très faible. Ces patients présentent des anémies constantes, contrairement au cas-type, sont parfois modérées, parfois atteignant des concentrations très basses justifiant des transfusions répétées durant leur existence(11,16).

Un risque augmenté de lithiase biliaire a été démontré chez cette population. Dans certains cas, il y a nécessité de pratiquer une cholécystectomie en cas de gêne pour le sujet ou lors d'une complication engageant le pronostic vital(60).

Par ailleurs, il a été démontré que le déficit en G6PD favorisait également le risque de thrombose vasculaire chez les patients atteints d'une drépanocytose(61).

6) Diagnostic

Les patients déficients en G6PD étant la plupart du temps asymptomatiques, le diagnostic est souvent fortuit voire tardif lors de l'apparition d'une crise hémolytique des suites d'une exposition à un agent oxydant(12).

Les sociétés savantes recommandent de dépister systématiquement un éventuel déficit en G6PD selon des critères établis (22,61,62) :

- avant l'introduction de certains traitements antipaludéens
- en cas d'anémie hémolytique non auto-immune chez le nouveau-né
- à l'apparition d'hémolyse des suites d'agents oxydants ou infections
- chez des patients ayant des antécédents familiaux de déficit en G6PD
- en cas de découverte au frottis sanguin de Corps de Heinz ou signe évocateur d'hémolyse
- en cas de thalassémie et drépanocytose
- à l'introduction d'un traitement par la rasburicase chez les patients atteints d'une hémopathie.

Le dépistage consiste en un dosage de l'activité enzymatique. Deux méthodes sont particulièrement utilisées : soit un test rapide de fluorescence soit une technique quantitative par spectrophotométrie(16). Plus récemment des techniques de biologie délocalisée (ou test directement au lit du patient) ont été développées avec des tests qualitatifs et aussi semi quantitatifs(30,63,64).

Toutefois cette méthode quantitative par spectrophotométrie, certes moins rapide et plus difficile à mettre en place, reste la technique de référence pratiquée dans les laboratoires spécialisés(63).

Des normes diagnostiques chez l'homme ont été fixées (65) :

- déficit avéré si le résultat est inférieur de 30 % de l'activité moyenne normale de la G6PD
- probable déficit entre 30 à 60 % de l'activité moyenne normale de la G6PD
- sans déficit à partir d'un résultat supérieur à 60 % de l'activité moyenne normale de la G6PD.

Cependant lors d'un épisode de crise hémolytique ou d'une transfusion, il est conseillé de retarder le dosage voire de réaliser un deuxième prélèvement à distance, du fait de la possibilité de normalisation du résultat. On évoque souvent un délai de 2 à 3 mois pour renouveler le dosage correspondant à la durée de vie des réticulocytes(37).

En effet durant la crise, des problèmes de diagnostic peuvent survenir liés à la présence d'un nombre plus élevé que la moyenne de réticulocytes sanguins. Contrairement aux érythrocytes, l'activité enzymatique retrouvée dans les réticulocytes est 5 fois plus élevée(36). L'activité enzymatique ayant tendance à diminuer au cours de la vie des érythrocytes, cette sélection transitoire avec des cellules plus jeunes entraîne un risque de faux négatif(36).

Ce phénomène est aussi constaté chez les nouveaux nés qui possèdent également des cellules érythrocytaires plus jeunes que chez l'adulte. Pour cette raison, chez les nouveaux nés, le test rapide de fluorescence même s'il demande une quantité de sang faible est déconseillé car il présente une forte source d'erreur diagnostique(40).

En cas de suspicion chez la femme, le diagnostic se révèle beaucoup plus complexe car le taux d'activité enzymatique est plus incertain que chez l'homme, avec une zone diagnostique complexe pour des activités enzymatiques comprises entre 30 et 80%(25).

Dans ce cas de figure d'ailleurs, l'utilisation d'un ratio comparatif G6PD/PK est parfois requis pour repérer un éventuel déficit en G6PD, la seule mesure de l'activité de la G6PD est rarement suffisante(37).

En effet l'activité en G6PD est proportionnelle à celle des autres enzymes du globule rouge et dépend de l'âge. Cela permet de repérer des différentiels d'activités diminués de G6PD par rapport aux autres enzymes avec la possibilité de rattraper des vrais déficits en G6PD bien que le pourcentage d'activité reste dans les normes établies(66).

D'autres techniques plus spécifiques ont également été instaurées afin de pallier cette difficulté comme l'utilisation de fluorochromes par cytométrie de flux au CHU de Rouen. Cela permet de distinguer la population érythrocytaire déficiente de celle normale en fonction de l'expression de certains marqueurs (formazan et oxyhémoglobine)(67–73).

D'autres examens moins spécifiques ont également leur importance pour une première orientation diagnostique afin d'évoquer ou éliminer le déficit notamment par la réalisation d'une NFS pour évaluer le taux d'hémoglobine et de réticulocytes. Un bilan biochimique avec le dosage de l'haptoglobine, LDH et le taux de bilirubine ainsi que le taux de ferritine et le bilan martial est également conseillé. Pour le diagnostic différentiel, le TDA (test direct à l'anti-globuline) est souvent effectué ainsi que parfois

une recherche de clone HPN (hémoglobinurie paroxystique nocturne)(74).

Concernant la place de la biologie moléculaire dans le diagnostic, le groupe de travail MCGRE (groupe expert concernant les maladies rares du globule rouge) a publié en mars 2019 une guideline reprenant toutes les pathologies du globule rouge pour son utilisation. Elle est utilisée en complément du dosage enzymatique en cas de suspicion d'anémie chronique hémolytique non sphérocytaire à la recherche de variant de classe 1, pour le diagnostic ainsi que dans le cadre d'une étude familiale ou du diagnostic prénatal(75).

Elle peut également avoir un intérêt dans le cas où le dosage phénotypique ne suffit pas à lui seul pour conclure, particulièrement chez les femmes hétérozygotes qui ont une forte suspicion clinique ou des activités enzymatiques comprises entre 30 et 80%(37).

Par ailleurs en cas d'association avec d'autres pathologies érythrocytaires, un panel NGS élargi est conseillé en première intention(75).

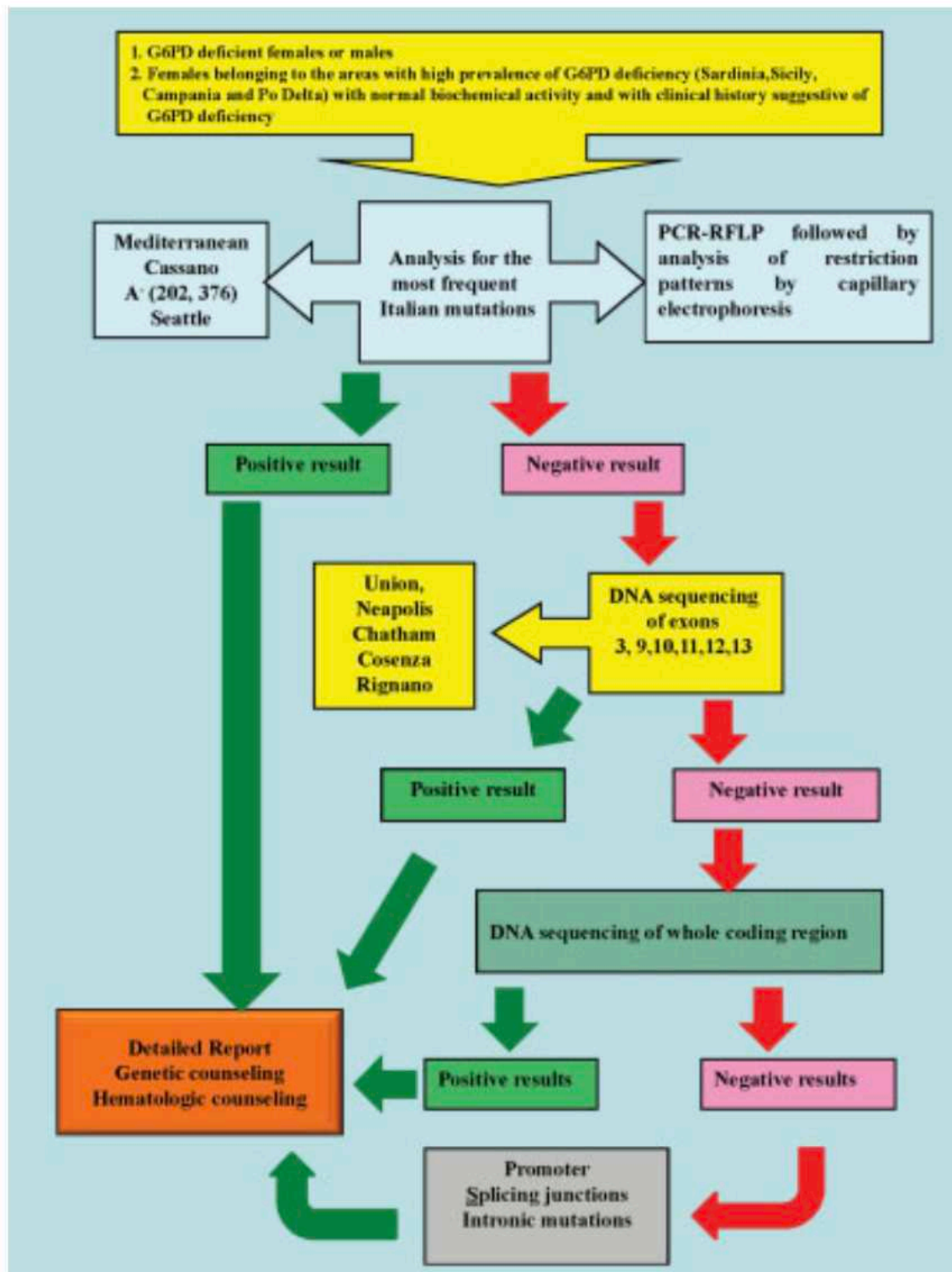


Figure 5: Attitude diagnostique d'un déficit en G6PD en cas de suspicion de déficit en Italie (36)

7) Prise en charge thérapeutique

Il n'existe pas de traitement spécifique pour lutter contre les crises hémolytiques chez les patients déficitaires en G6PD(11).

Le traitement repose exclusivement sur l'éviction des substances connues susceptibles d'engendrer une crise hémolytique, par exemple des traitements comme la dapson, l'acide nalidixique et la primaquine(11).

En cas d'hémolyse, le traitement est plutôt symptomatique avec l'hydratation du patient et des supplémentations vitaminiques (B9 et B12). Le recours à la transfusion est globalement peu fréquent, pratiqué uniquement dans les formes les plus sévères. Dans la plupart des cas, les événements hémolytiques guérissent spontanément(11).

Dans le cas de l'hyperbilirubinémie sévère du nourrisson, le traitement reste également symptomatique avec de la photothérapie couplée à l'échange transfusionnel(15,53,54,56,59).

Pour les patients présentant une anémie hémolytique chronique, la splénectomie est rarement recommandée en raison de nombreux risques infectieux et thrombotiques(11).

Des thérapeutiques fondées sur des traitements antioxydants ont été explorées comme l'utilisation de l'acide ascorbique (vitamine C), la vitamine E et l'acide alpha lipoïque mais se sont révélées inefficaces(76).

Plusieurs nouvelles alternatives thérapeutiques sont en cours de validation avec l'utilisation de la NAC (N-acétylcystéine) dans la biosynthèse du glutathion, la recherche sur les voies compensatoire du NADPH, la correction enzymatique ou l'augmentation de la production de la G6PD via des petites molécules, telles que l'AG1, une protéine chaperonne qui permettrait de stabiliser l'enzyme G6PD sous sa forme active dimérique en renforçant la zone de fixation des 2 monomères(76).

II – Le déficit en Pyruvate Kinase

1) Définition

La pyruvate kinase (PK) est une enzyme du cycle de la glycolyse. Elle correspond à la dernière étape du cycle par la transformation de phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate. Cette réaction enzymatique est à l'origine d'une production d'ATP qui fournit l'énergie dont les cellules ont besoin. L'ATP est indispensable pour le métabolisme des différentes cellules de l'organisme notamment des globules rouges dépourvus de mitochondrie(5,66,77–82).

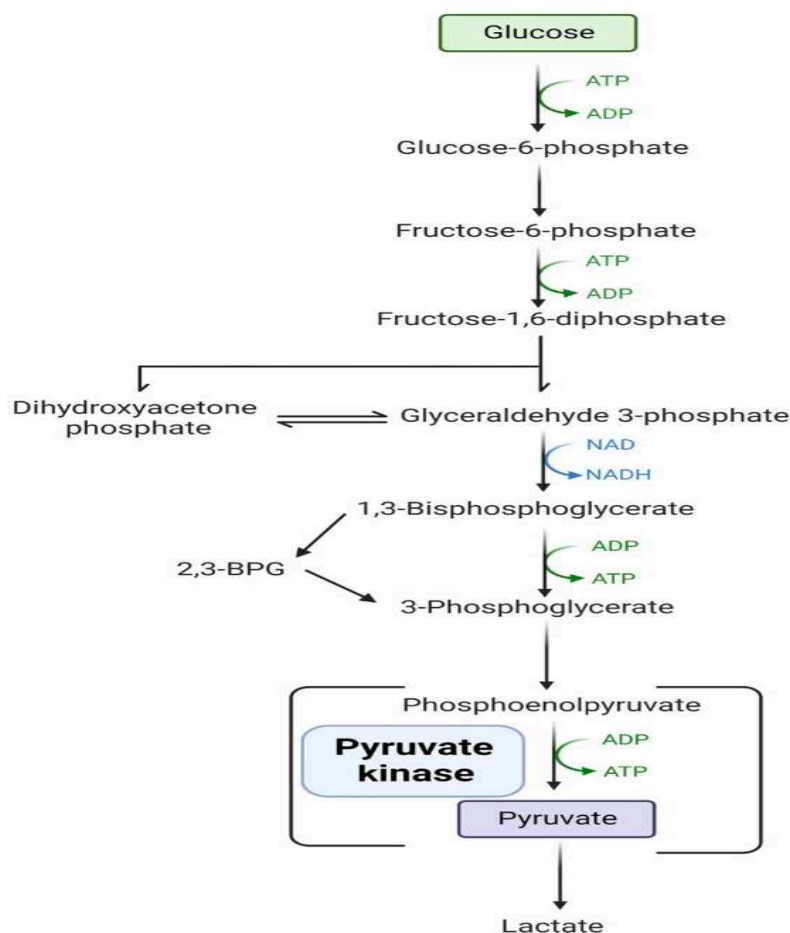


Figure 6 : Cycle enzymatique de la pyruvate kinase. (84)

Elle est présente dans l'organisme sous plusieurs isoformes distinctes qui varient en fonction des besoins métaboliques des tissus dans lesquels on les retrouve. Dans chaque tissu, plusieurs isoformes peuvent être exprimés. Toutefois, dans une cellule, un seul isoforme est exprimé(83).

Elle est constituée au global de 4 isoenzymes chez l'être humain qui possèdent chacune des expressions tissulaires propres. Parmi ces différents isotypes, on distingue (83) :

- PKM1 qui se trouve en grande majorité dans les tissus striés comme les muscles, le cerveau et le cœur
- PKM2, la forme embryonnaire qui joue un rôle dans la prolifération cellulaire. Au fur et à mesure de la maturité cellulaire, cette forme diminue en faveur des formes PKL et PKR. Elle est toutefois exprimée dans la plupart des tissus humains.
- PKL est exprimé dans les cellules du foie, de l'intestin grêle et présente en minorité dans le rein
- PKR qui est l'isoforme majoritaire dans les érythrocytes.

2) Épidémiologie

Le déficit en PK est considéré comme le plus fréquent déficit héréditaire enzymatique de la glycolyse intra érythrocytaire causant une anémie hémolytique chronique non sphérocytaire(2,66,83). Toutefois cela reste un trouble rare de transmission autosomique récessif. La prévalence du déficit est estimée entre 3,2 et 8,5 cas pour un million chez des patients diagnostiqués dans les populations occidentales. Elle serait estimée dans le monde à environ 51 cas pour un million d'habitants. L'hétérogénéité clinique et les difficultés diagnostiques expliquent les discordances de prévalence retrouvées dans les différentes études(84).

Contrairement au déficit en G6PD, il ne semble pas avoir de différence intersexe sur la prévalence. Toutes les populations ethniques seraient touchées par le déficit en PK mais certaines populations connaissent une fréquence plus élevée. La zone d'endémie palustre et certaines populations méditerranéennes seraient les plus touchées(85). La communauté Amish et la communauté Rom posséderaient quant à eux un génotype propre lié sûrement à un effet fondateur(79).

L'effet fondateur est un concept de génétique sur les populations. Il se produit lorsqu'un petit groupe d'individus issu d'une population plus grande s'établit dans une nouvelle région isolée géographiquement. Ce groupe, appelé "groupe fondateur", ne représente qu'une faible partie de la diversité génétique de la population d'origine. En conséquence, la nouvelle population issue du groupe fondateur présente souvent une variation génétique réduite et des fréquences alléliques différentes de celles de la population d'origine. Cet effet peut entraîner des caractéristiques génétiques spécifiques dans la nouvelle population, parfois même des maladies génétiques

rare si les allèles responsables sont présents chez les fondateurs(86,87).

3) Génétique

Les différentes isoformes de PK sont régulées par 2 gènes distincts, le gène PKM situé dans le chromosome 15 qui régule les isoformes PKM1 et PKM2 et le gène PK-LR situé dans le chromosome 1 qui régule les isoformes PKL et PKR(85).

Dans le cadre du déficit en PK, seules les mutations sur le gène PK-LR ont un lien avec les anémies hémolytiques érythrocytaires. Le gène PK-LR est situé dans le bras long du chromosome 1 en position q21. Sa taille est d'environ 9,5 kb et est constitué de 12 exons. Parmi ces 12 exons, 10 exons sont communs dans la transcription en ARNm pour les isoformes PKR et PKL. Les 2 autres exons sont spécifiques d'isoformes : l'exon 1 pour l'isoforme PKR et l'exon 2 pour l'isoforme PKL. Au total, le monomère PKR est composé de 574 acides aminés codés par le gène PK-LR(83).

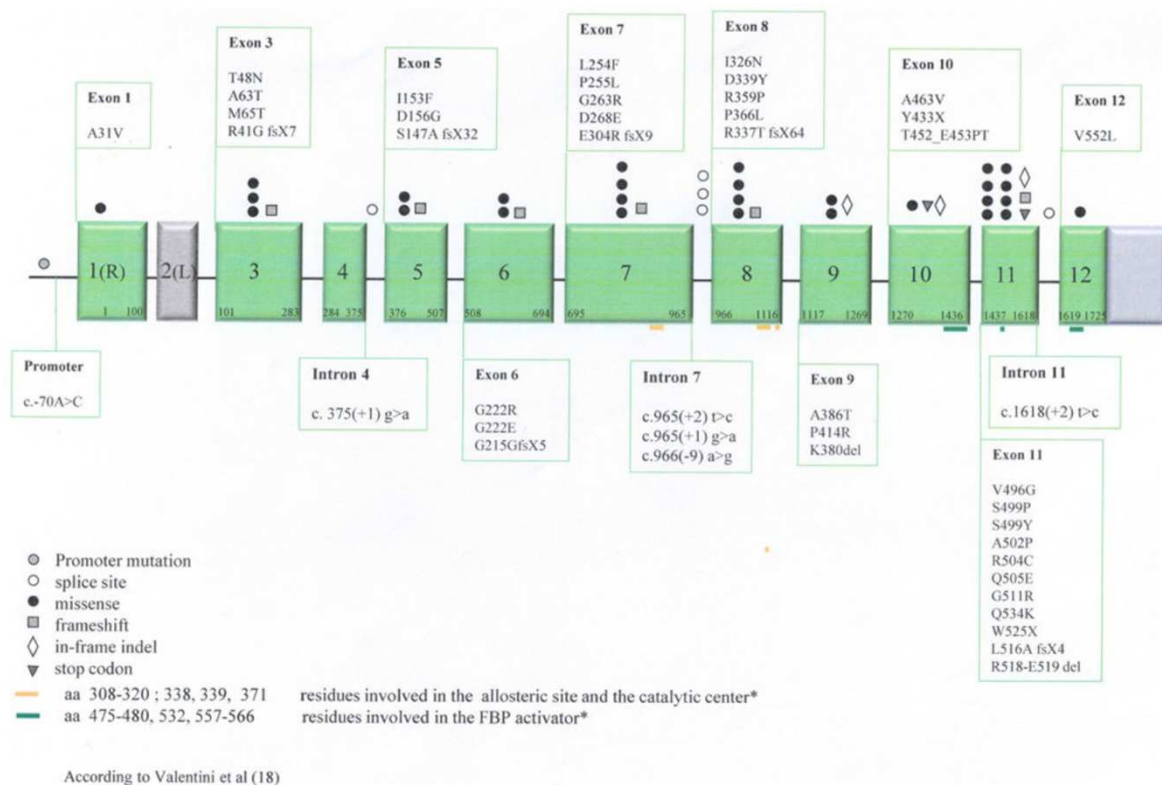


Figure 7 : Gène PK-LR et ses différents exons.(88) On retrouve certaines des mutations décrites. La majorité des variants présents sont de faux sens représenté par un rond noir.

Plus de 300 variants ont été reportés à ce jour et cela tend à croître avec les années.

Par exemple en 2020, the Human Genome Mutation Database (HGMD) dénombrait 290 variants classés comme pathogènes et cette base de données ne prend pas en compte tous les variants détectés dans le monde(89).

Ces variants sont retrouvés sous forme hétérozygote composite (présence de 2 variants pathogènes différents dans un même gène) ou homozygote (atteinte des 2 allèles d'un même gène)(85,90).

Les variants sont répartis dans tous les exons du gène avec une fréquence supérieure dans les exons 5,8,9 et 11(91). Les 2 variants les plus fréquemment trouvés se situent dans l'exon 11. Le variant Arg510Gln est majoritairement décelé chez les Européens du Nord et aux États Unis hors Amish tandis que c'est principalement le variant Arg586Trp dans la population Européenne du Sud et en

Inde. Un variant spécifique p.R479H est retrouvé dans la communauté Amish(66).

Mutation	Effect	Exon	Mutation type	Geographical distribution/ethnicity	rs	Allelic frequency (gnomAD Exome)	Ref.
c.1529G>A	p.R510Q	11	Missense	Nothern EU, USA	rs113403872	0.000358	34
c.1456C>T	p.R486W	11	Missense	Southern EU, India	rs116100695	0.00305	34,36
c.1468C>T	p.R490W	11	Missense	Japan	rs200133000	0.000127	37
c.721G>T	p.E241*	7	Nonsense	Caucasian	rs201953584	0.0000485	16
c.994G>A	p.G332S	8	Missense	Caucasian	rs773626254	0.0000557	16
c.992 A>G	p.D331G	8	Missense	India	rs1443439423	0.00000398	36
Pathogenic variants with strong ethnic association							
c.1436G>A	p.R479H/abnormal splicing	10	Missense/splicing	Pennsylvania Amish, Indian	rs118204085	0.000127	36,38
c.829G>A	p.E277K	7	Missense	African	rs147689373	0.000694	39
c.1437-518_1618+440del	1149 bp deletion	i10-i11	Large deletion	Roma community	na	na	40
c.283+1914_1434del	5006 bp deletion	i3-10	Large deletion	Vietnamese	na	na	17,41

Tableau 3: Mutations les plus communes du gène PKLR et sa distribution ethnique et allélique (91)

La plupart des variants, environ 70% à 80%, sont des substitutions faux sens (changement d'un nucléotide modifiant l'acide aminé). On retrouve également avec une fréquence moins importante des mutations perturbatrices de type codon stop, frame shift ou de grande délétion entraînant des anomalies de structure ou de fonction catalytique de l'enzyme avec des conséquences cliniques plus graves(91).

4) Structure de l'enzyme (92)

La PK est une enzyme dont la structure complète a été décrite dans les années 1990 par de nombreux auteurs avec une première description par Kraulis et ses collègues en 1991 se fondant sur des modèles cristalloïdes. La PK a une taille d'environ 200 kDa (kilo dalton) et est présente sous forme de tétramère formé de 4 sous-unités identiques.

Chaque sous-unité est constituée de 4 domaines (A, B, C et N-terminal). Les domaines A, C et N-terminal sont fortement liés entre eux. Ils constituent la majorité du corps de la sous-unité avec un domaine B exclusivement lié au domaine A.

Les 4 sous-unités sont assemblées entre elles de façon à obtenir un oligomère symétrique appelé D2 avec une légère variation pour le domaine B.

Si on considère l'assemblage selon un modèle bidimensionnel, il existe dans l'axe vertical, 2 sites de liaison entre les domaines A et dans l'axe horizontal 2 sites de liaison entre les domaines C.

Chaque domaine a sa fonction propre :

- Le domaine A contient le site de liaison au substrat comme la PEP et joue un rôle dans l'activité catalytique de l'enzyme
- Le domaine B est impliqué dans la régulation allostérique et influe lui aussi sur l'activité enzymatique par ses changements d'orientations
- Les domaines N-terminal et C jouent un rôle dans la structure et la stabilité de l'enzyme.

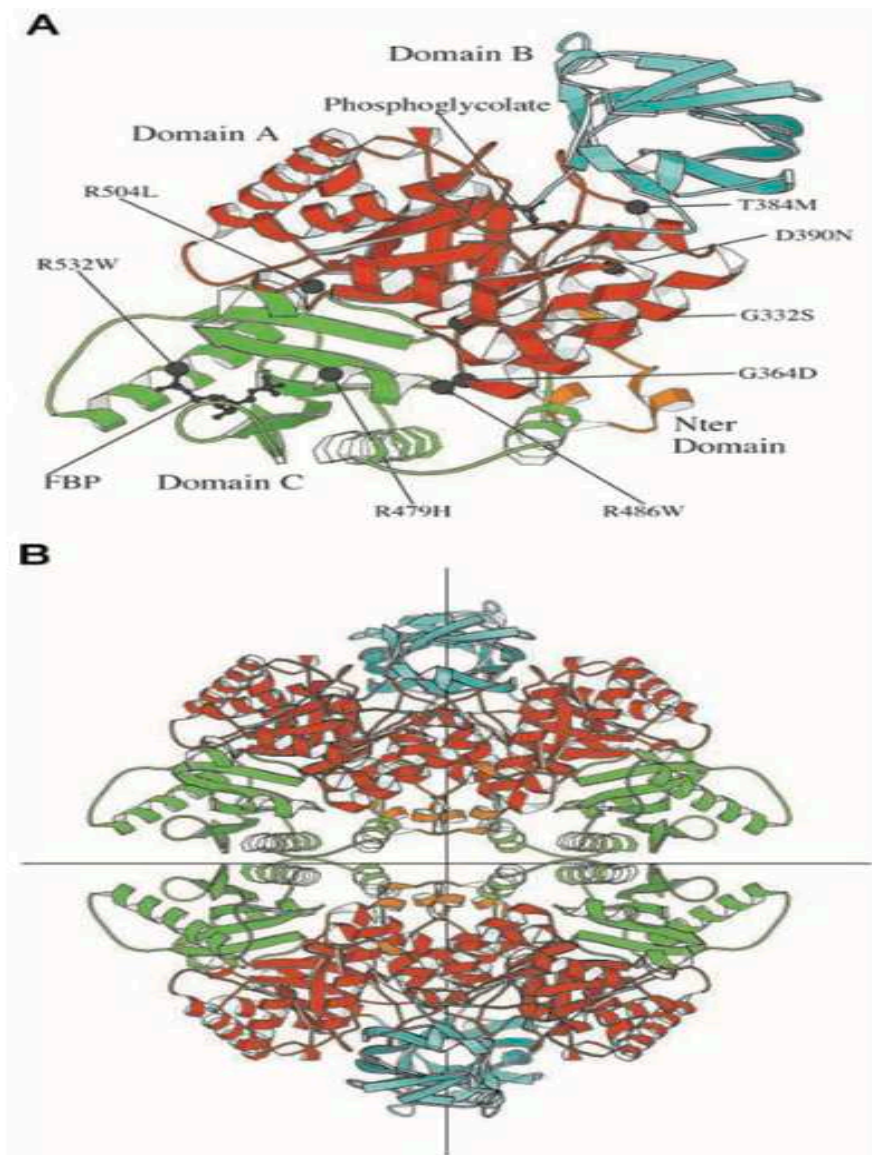


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de la PKR. (93) Les 4 domaines sont représentés avec en vert le domaine C, en jaune le domaine N, en rouge le domaine A et bleu le domaine B. On retrouve par ailleurs sur le schéma du haut, quelques mutations les plus fréquentes et leur position. (Comme R479H variant amish, R486W variant majoritaire du Sud de l'Europe)

2 sites fonctionnels de l'enzyme ont été décrits :

- Le site catalytique situé dans la partie supérieure du domaine A, il permet la conversion du PEP en pyruvate. Il est constitué d'un réseau complexe de liaison hydrogène et d'interactions permettant la stabilisation des différents substrats.
- Le site allostérique situé dans le domaine C joue un rôle de régulateur de

l'activité enzymatique en permettant la liaison de certaines molécules comme le FBP (fructose 1,6 biphosphate) modifiant la conformation de l'enzyme pour augmenter son activité.

Une analyse des variants faux-sens responsables d'une anémie hémolytique non sphérocytaire révèle que la majorité de ces variants se concentre dans des régions spécifiques de la protéine. C'est le cas dans l'interface possédant de nombreuses interactions polaires entre les domaines A et C, l'interface entre les sous-unités A/A, la partie hydrophobe du domaine A, ainsi que le site de liaison du FBP.

5) Clinique

La présentation clinique du déficit en PK est hétérogène avec des manifestations variées pouvant aller d'une symptomatologie légère à des complications plus graves in utero(85).

Les symptômes et les signes cliniques sont communs avec toute anémie hémolytique chronique (fatigue, pâleur avec essoufflement chronique en lien avec l'anémie). Des signes d'ictères liés à l'accumulation de bilirubine circulante et une splénomégalie (80%) sont aussi constatés. Ces symptômes conduisent dans la plupart des cas à des transfusions sanguines itératives fréquentes chez les patients. Les symptômes ne sont pas forcément corrélés à la sévérité de l'anémie : en effet pour des valeurs d'hémoglobines identiques, la symptomatologie peut être totalement différente(83).

Dans les complications fréquentes de la maladie, on retrouve une augmentation de la surcharge en fer, dans 50% des cas, qui survient indépendamment des transfusions ou d'une splénectomie. Cette manifestation s'explique par un phénomène de compensation avec une augmentation de l'absorption intestinale du fer liée à l'anémie chronique persistante(85).

La présence de calcul biliaire est constatée dans 30% des cas nécessitant une cholécystectomie. La présence de calcul biliaire et de surcharge en fer est observée à tout âge de la maladie(66).

Selon les groupes d'âges, des complications cliniques différentes avec des particularités chez le nouveau-né, l'enfant et l'adulte ont tout de même été déterminées(85).

Chez le nouveau-né, les principales manifestations cliniques graves retrouvées sont le retard de croissance in utero et l'ictère nucléaire(85). De très rares cas de mort in utero avec hydrops fetalis liés à un déficit en PK ont par ailleurs été décrits sans que le mécanisme ne soit bien établi(93).

Des signes d'hématopoïèse extra médullaire visibles sur la peau peuvent être également observés(85).

Chez l'adulte, du fait de l'évolution chronique de la maladie, les complications sont plus fréquentes et variées que chez l'enfant. Pour exemple, la présence d'une hypertension pulmonaire est certes plutôt rare mais elle impacte fortement la qualité de vie des patients. Une augmentation du risque d'ulcères de jambes par rapport à la population générale est également décrite. De plus, des cas d'ostéopénie ou d'ostéoporose participant à une augmentation du risque fracturaire sont retrouvés chez la majorité des patients âgés déficients en PK(85).

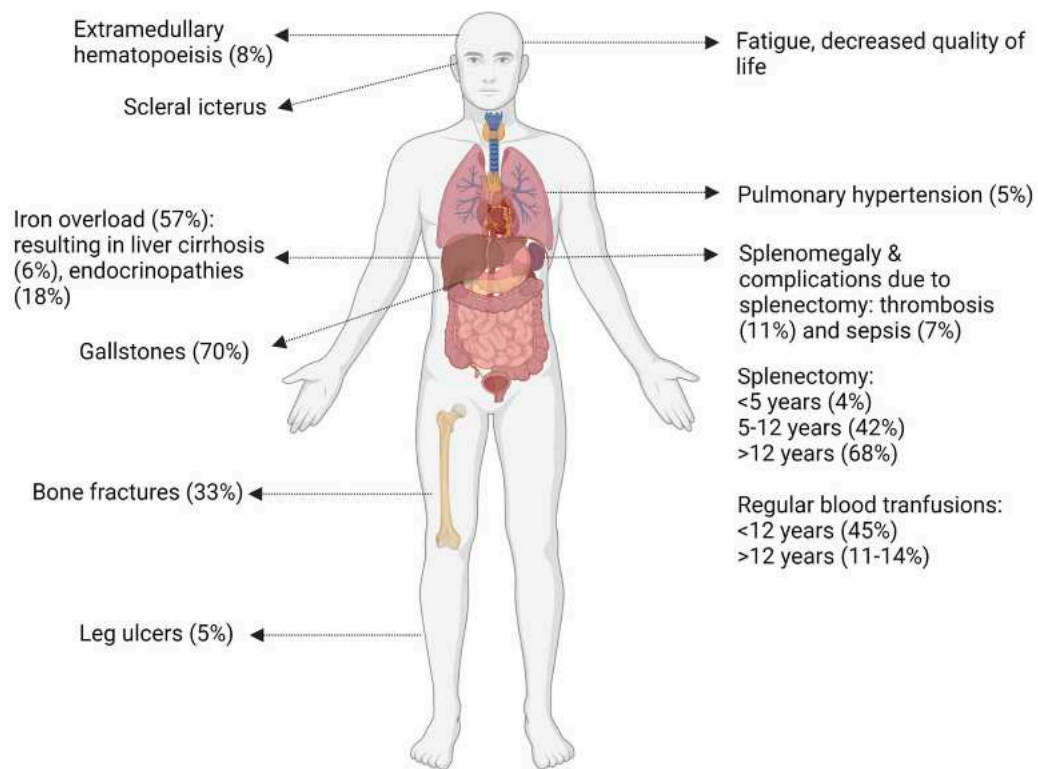


Figure 9 : Représentation des symptômes et complications du déficit en PK(88)

6) Diagnostic

Le diagnostic du déficit en PK est avant tout un diagnostic d'exclusion. Il est suspecté chez les patients ayant une anémie chronique après avoir éliminé les autres causes plus fréquentes comme la drépanocytose, l'AHAI et les thalassémies(66).

Comme pour le déficit en G6PD, les marqueurs biologiques généraux d'hémolyse participent à l'aide au diagnostic. Toutefois ces examens restent non spécifiques et il n'y a pas de morphologie des globules rouges ou de marqueurs exclusifs du déficit en PK(83).

Une combinaison de 2 tests biologiques est préconisée pour le diagnostic étiologique du déficit en PK. Il s'agit de la mesure d'activité enzymatique par spectrophotométrie et/ou le séquençage du gène PK-LR(66,83,85,91).

L'existence d'interférence du dosage enzymatique explique ces recommandations. Des taux bas d'activité enzymatique sont retrouvés chez des patients porteurs sains. Inversement en cas de transfusion ou de déplétion incomplète des leucocytes et des plaquettes, le taux d'activité peut également être faussement normal(83).

L'utilisation de ce test peut donc être à l'origine de mauvais diagnostics.

Le séquençage du gène *PK-LR* permet de s'affranchir de ces interférences analytiques même si des limites techniques persistent encore(66). Certains variants dans des zones introniques profondes peuvent ne pas être détectés. De plus, des difficultés de classification de certaines variants appelés VSI impactent également le

diagnostic(83).

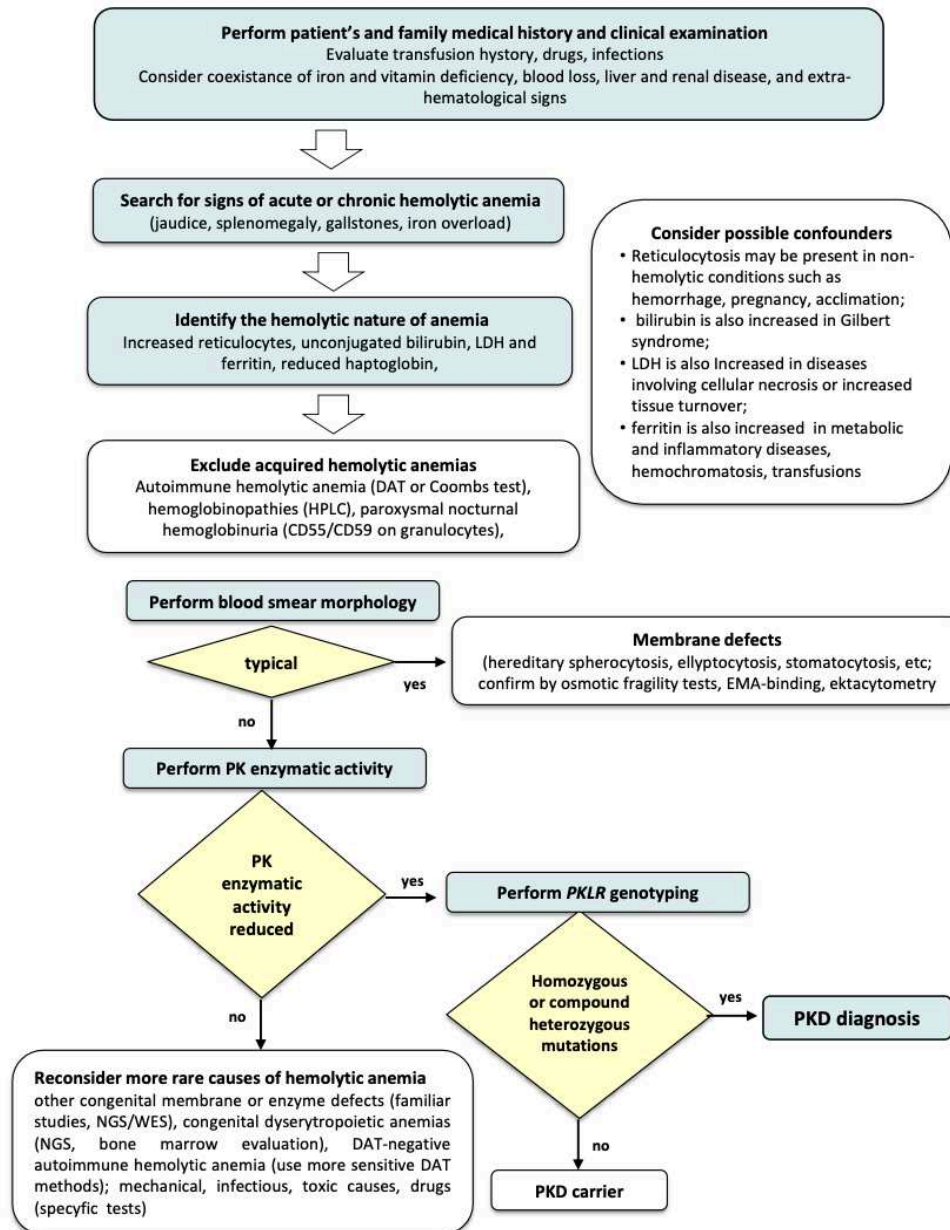


Figure 10 : Arbre diagnostique du déficit en PK et éventuel diagnostic différentiel (67)

7) Thérapeutique

Le traitement par supplémentation est la première base de la prise en charge du déficit en PK, avec une supplémentation en acides foliques voire en vitamine B12. Étant donné le risque important de surcharge en fer, l'utilisation ponctuelle de molécules chélatrices est souvent conseillée(66,85).

Le recours à la transfusion est fréquent avec environ 84 % des patients l'ayant été au moins une fois dans leur vie, généralement dans les premières années de vie. Il a tendance à diminuer au fur et à mesure des années en partie en lien avec la splénectomie(66).

Du fait d'une tolérance accrue grâce à des mécanismes compensatoires, l'indication d'une transfusion doit s'appuyer sur la symptomatologie et les signes cliniques mais pas sur une valeur seuil d'hémoglobine comme pour d'autres pathologies hématologiques(85).

Parmi les thérapeutiques disponibles, on retrouve la splénectomie qui est utilisée chez les patients ayant des besoins transfusionnels réguliers et importants. Du fait des nombreux risques infectieux et thrombotiques, il est fortement conseillé de splénectomiser les enfants seulement après l'âge de 5 ans(66,85).

Son efficacité reste néanmoins variable et des signes d'hémolyse post splénectomie sont possibles avec persistance de l'anémie chronique.

Par ailleurs, la splénectomie n'empêche pas la formation de calcul biliaire ni l'hyperbilirubinémie(85).

La transplantation de CSH (cellule souche hématopoïétique) est une option possible.

Cependant les risques de complications notamment la GVH (maladie du greffon) la rendent peu envisageable(66).

L'avenir semble s'orienter sur des médicaments tels que le Mitapivat qui est un activateur allostérique par voie orale de la PK. Il a une double action avec la stimulation de la production d'ATP et la réduction de la 2-3DPG(85).

Une amélioration de la concentration d'hémoglobine de 1,5 g/dl de moyenne associée à une amélioration des marqueurs d'hémolyse sont décrites. Ce traitement possède une excellente efficacité chez les patients possédant au moins un variant de type faux sens à l'exception du variant R479H sous forme homozygote. Par ailleurs une absence de résultat a également été constatée chez les patients possédant des variants non faux sens(81).

Dans l'essai de phase 3 « THE ACTIVATE STUDY », le médicament semble avoir un impact significatif sur le nombre de transfusions nécessaires par rapport au groupe placebo. Il est actuellement passé en phase 4 et des études complémentaires sur son efficacité chez l'enfant et dans d'autres pathologies du globule rouge sont en cours(81).

Une autre molécule, l'Etanopivat, semble également très prometteuse avec un mécanisme d'action sensiblement similaire au Mitapivat. Une étude de phase 3 est en cours avec une fin estimée en avril 2027(94).

L'usage de la thérapie génique est une autre possibilité en cours d'exploration(78).

PARTIE 2 : MÉTHODES DE DOSAGE :

I –Les méthodes de dosage enzymatique

1) Dosage enzymatique par spectrophotométrie (95)

Les dosages enzymatiques sont actuellement réalisés selon les méthodes de référence définies par E.Beutler en 1977 et reprises en 1984 par l'International Committee for Standardization in Hematology (ICSH). La technique s'appuie sur la mesure par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 340 nm de l'activité des différentes enzymes chauffées à une température de 37°C.

Ce test se fait généralement sur un prélèvement effectué sur tube EDTA (éthylène diamine tetra acétite) ou ACD (acide citrate dextrose). La quantité minimale nécessaire est de 1ml de sang. Une lyse des différentes cellules du sang est préalablement effectuée afin d'éliminer les plaquettes et les leucocytes. Le prélèvement est stable jusqu'à 24 heures à température ambiante. Sa conservation à 4°C est de 6 jours. L'unité de référence internationale est exprimée en activité enzymatique/par gramme d'hémoglobine.

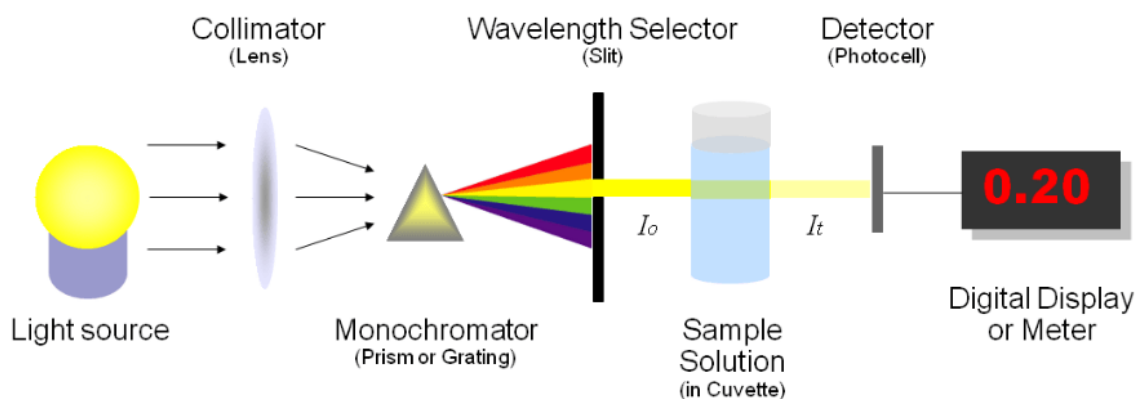


Figure 11: Structure et principe de base d'un spectrophotomètre(96)

Les différentes étapes pré analytiques communes aux différents enzymes s'enchaînent :

- plusieurs méthodes d'isolation des globules rouges existent avec soit des techniques de filtrations ou alors des techniques de lavages et de dilutions. La technique la plus fréquemment utilisée, correspond à une séparation via une colonne de cellulose.

- après cette étape, un hémolysat est réalisé à partir d'un mélange entre le sang du patient dépourvu de plaquettes et leucocytes avec une solution de stabilisation contenant de l'EDTA associé à du mercaptoéthanol.

En cas d'absence de possibilité de réaliser le dosage immédiatement, l'hémolysat est congelé.

Les dilutions nécessaires et l'ajout du mélange réactionnel sont réalisés après la préparation de l'hémolysat.

2) Les tests rapides de fluorescences (97)

Dans les pays en voie de développement notamment en Malaisie, des tests de diagnostic rapide utilisant la fluorescence ont été implantés en raison de leur facilité d'accessibilité. La rapidité et la simplicité de ce test sont un autre argument expliquant leur utilisation. Le principe a été mis en place par E.Beutler en 1966. Il s'appuie sur le fait que les nucléotides de pyridine contenus dans la NADPH en présence d'une lampe à onde UV émettent une fluorescence en cas d'activité G6PD normale. Chez les patients déficients en G6PD, le NADPH est insuffisamment produit, entraînant une absence ou une faible fluorescence.

Pour la PK lors d'une activité normale, le phénomène est inverse : la PEP contient de la pyridine et lors de la transformation en pyruvate, la pyridine est modifiée ce qui produit une absence de fluorescence en cas d'exposition à une lampe UV. Les patients déficients, eux, produisent peu de pyruvate donc une présence de fluorescence est constatée.

La technique dans le cas de la G6PD se déroule comme suit :

- on mélange 10 μ mol du sang du patient provenant d'un tube EDTA ou ACD auquel on rajoute 100 μ mol d'un kit contenant un mélange réactionnel.
- une incubation du mélange est nécessaire pendant 5 à 10 minutes idéalement à 37°C ou à température ambiante puis on dépose le mélange sur un filtre contenant 10 micromoles de sang séché qu'on expose à la lampe UV à une longueur d'onde de 465 nm.

En cas d'absence de déficit, une fluorescence doit apparaître.

Un témoin positif est utilisé afin de s'assurer du bon fonctionnement de la technique.

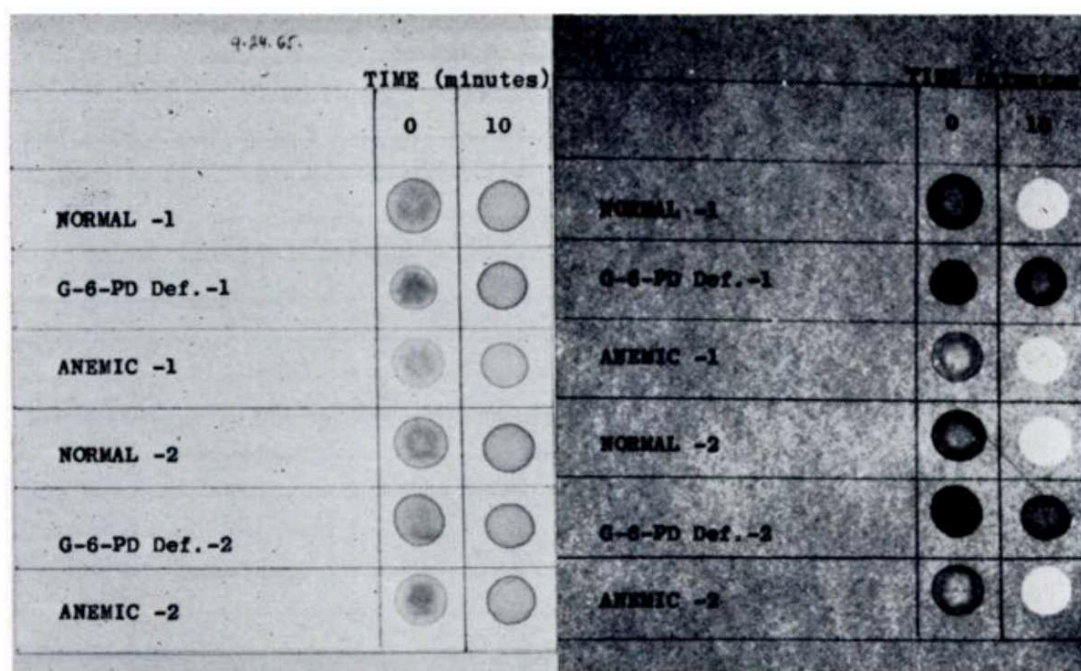


Figure 12: Résultat du test de fluorescence spot pour le déficit en G6PD (98)

3) Dosage enzymatique de référence pour la G6PD (37)

G6PD:

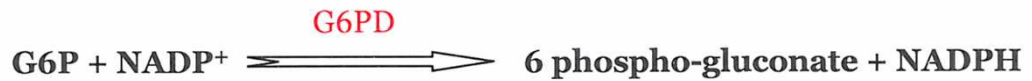


Figure 13: Principe de la réaction enzymatique du G6PD

La mesure de la G6PD est basée sur la réaction NADP- NADPH comme décrite ci-dessus. On incube l'hémolysat et les réactifs pendant 5 à 10 min à 37°C avant l'ajout du substrat de G6P. Puis on mesure la vitesse de production de NADPH par la mesure d'absorbance pendant une durée de 10 à 15 minutes.

Le taux de G6PD est proportionnel au taux de NADPH produit mesuré à une longueur d'onde de 340 nm. L'absorbance est mesurée en DO (densité optique) puis convertie en UI/g Hb (micromole/min/Hb).

4) Dosage enzymatique de référence pour la PK(83)

1^{ère} réaction en excès de substrat :



2^{ème} réaction de dosage du pyruvate formé :



Figure 14 : Principe de la réaction enzymatique du PK

La mesure du PK est fondée sur la réaction de la PEP-Pyruvate avec le LDH et NADP représentée ci-dessus. Deux réactions successives sont effectuées à une température de 37°C à l'issue desquelles on mesure la diminution DO liée à la consommation de NADH par rapport au seuil de référence. Ces unités sont transformées en UI (micromole de substrat/min/Hb).

5) Avantage et inconvénient des dosages enzymatiques

Le test rapide de fluorescence a pour avantage sa facilité d'accès notamment pour les pays faiblement industrialisés(8,63,98).

Il a une très bonne sensibilité mesurée parfois entre 91% et 100% selon certaines études et une spécificité à 99,9% pour les taux enzymatiques inférieurs à 30 %(63).Cela peut s'avérer donc suffisant pour les cas évidents de déficits en G6PD.

Mais sa spécificité baisse drastiquement lorsque les taux d'activité enzymatique avoisinent 60% allant d'une spécificité de 65% jusqu'à seulement 29%. Ce test a donc un grand intérêt dans le cadre du dépistage mais s'avère très limité pour le diagnostic avec un risque important de sous-estimation(99).

Le gold standard pour le test quantitatif G6PD reste la spectrophotométrie(16). Cependant, ce test est complexe et nécessite des techniciens de laboratoire suffisamment formés et expérimentés. L'équipement de laboratoire dédié est coûteux à acquérir. Toutefois cette technique permet de donner un taux d'activité précis et plus fiable pour diagnostiquer des déficits modérés en G6PD. De plus ce test peut être couplé en une seule analyse aux autres enzymes érythrocytaires. Les 2 principales interférences restent la transfusion et la crise hémolytique sévère avec risque de surestimation des taux pour lequel l'utilisation de ratio permet de s'en affranchir(37).Afin d'obtenir des résultats fiables, la première étape pré analytique est essentielle mais nécessite plusieurs techniques manuelles précises avec des risques d'erreurs humaines.

II -Les Tests cytofluorométriques :

1) Description des techniques cytochimiques

En raison de la faible efficacité diagnostique des tests enzymatiques chez la femme hétérozygote, des tests cytochimiques ont vu le jour pour mieux discriminer les différentes populations de globules rouges.

Le premier test cytochimique a été développé dans les années 1960 par Brewer J, fondé sur la cytoréduction de la méthémoglobine oxydée en oxyhémoglobine via l'action de la NADPH produit de la G6PD. Après coloration de l'échantillon avec du bleu de méthylène ou bleu de Nil, un frottis sanguin est réalisé. On observe par microscopie optique une variation de couleurs entre les globules rouges déficients (en gris) et globules rouges non déficients (rouge clair). Cela permet de distinguer clairement la double population érythrocytaire et de quantifier la proportion de cellules déficientes par rapport aux cellules normales(100).

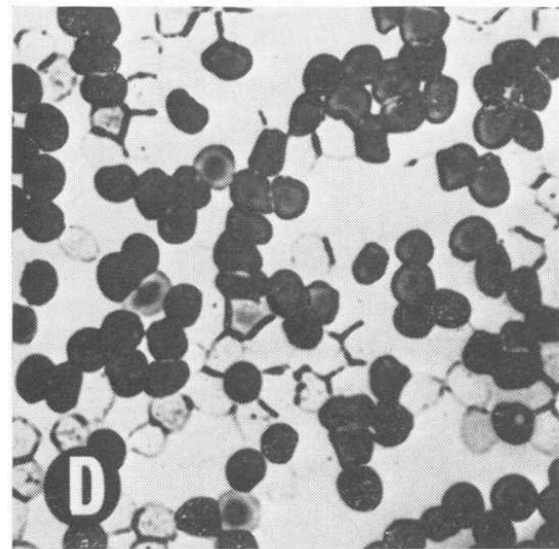
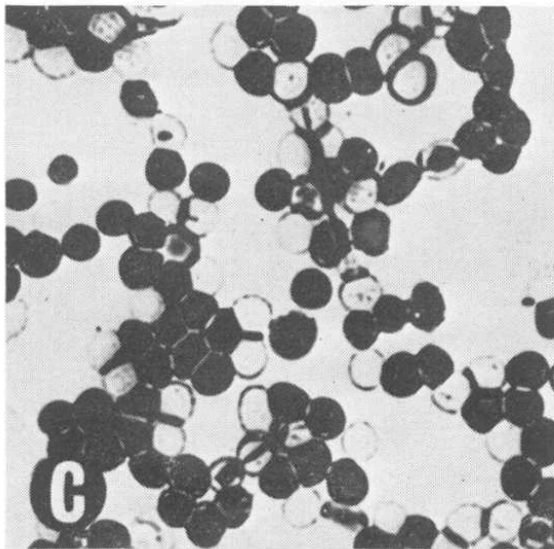
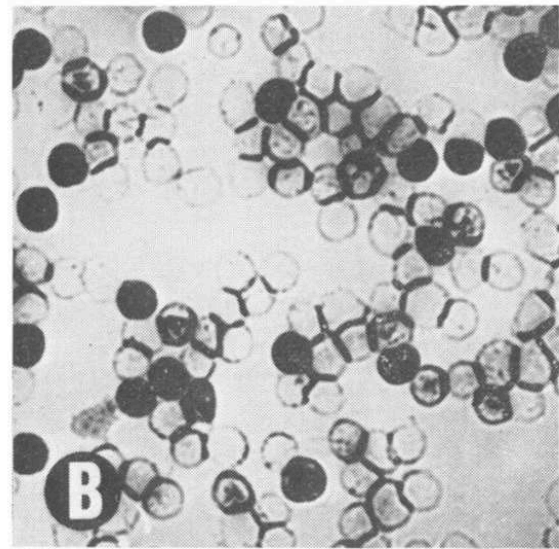
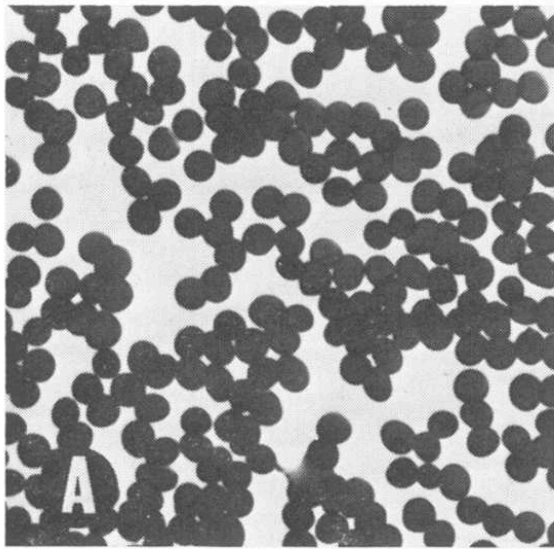


Figure 15 : Test d'élution de méthémoglobine Figure A population normale, B déficiente, C et D hétérozygote.
(102)

Fairbanks et Lampe en 1969 ont créé une variante de ce test amélioré par Van Norden et ses collègues. Le principe du test est la réduction du sel de nitrobleu de tétrazolium incolore par une enzyme, le méthosulfate de 1-méthoxyphénazine avec pour produit final le formazan qui émet une couleur foncée violacée. Celle-ci dépend de l'action de la NADPH par la transformation de méthémoglobine en hémoglobine. La réduction du tétrazolium n'est possible qu'en présence d'hémoglobine et non avec la méthémoglobine. Donc les érythrocytes contenant du formazan expriment une coloration violette et ceux qui en sont dépourvus ne produisent aucune coloration. De ce fait via un comptage-manuel par microscopie optique, on peut estimer le taux de globules rouges déficients en G6PD(72).

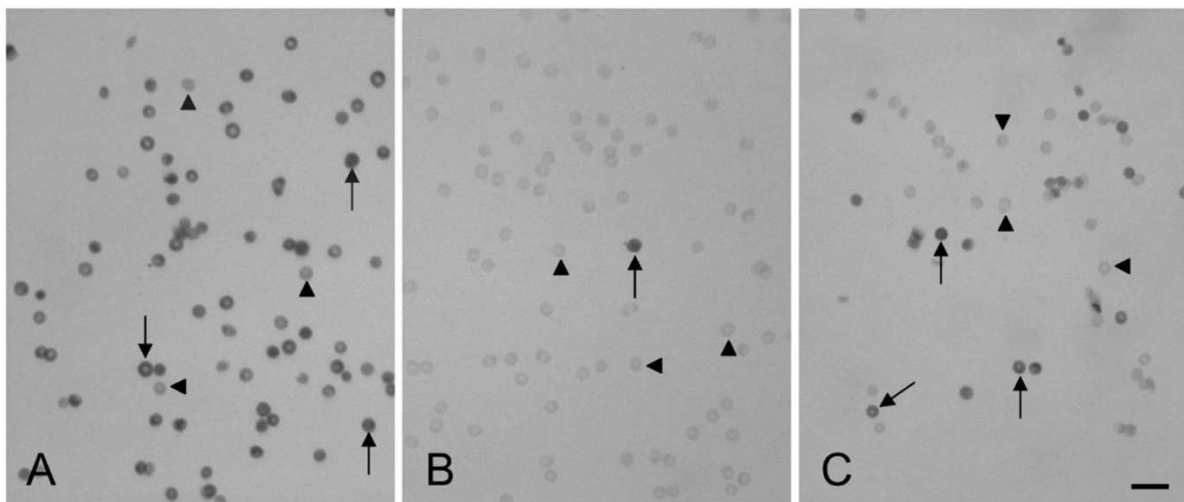


Figure 16 : Test de réduction de sel tétrazolium. Population A : patient sans déficit en G6PD, B Patient déficitaire hémizygote. C patiente hétérozygote. (73)

Cependant ces techniques sont complexes, longues et sources d'erreurs. De ce fait elles ont été abandonnées au profit de techniques plus fiables et utilisables en routine.

2) Description générale de la Cytométrie en Flux (101)

La CMF est une technique multiparamétrique permettant de séparer les différentes populations cellulaires d'une solution. Ces populations cellulaires sont séparées au contact d'un faisceau laser en fonction de ses propriétés optiques. Les paramètres utilisés pour la séparation des cellules sont l'intensité de la fluorescence émise par différents marqueurs, la taille et la structure cellulaire grâce au phénomène de diffraction des signaux lumineux. Les échantillons sont préalablement traités par des fluorochromes spécifiques des protéines ou anticorps. Puis les cellules sont ensuite excitées par un ou plusieurs lasers à une longueur d'onde prédéterminée et émettent ou non une fluorescence. Cette fluorescence est ensuite lue sous forme de signaux électriques par des détecteurs comme les photodiodes puis analysée via un ordinateur sous forme de données standardisées.

La CMF dispose d'une multitude d'applications et de techniques diverses. Elle est utilisée par conséquent dans le diagnostic de nombreuses pathologies.

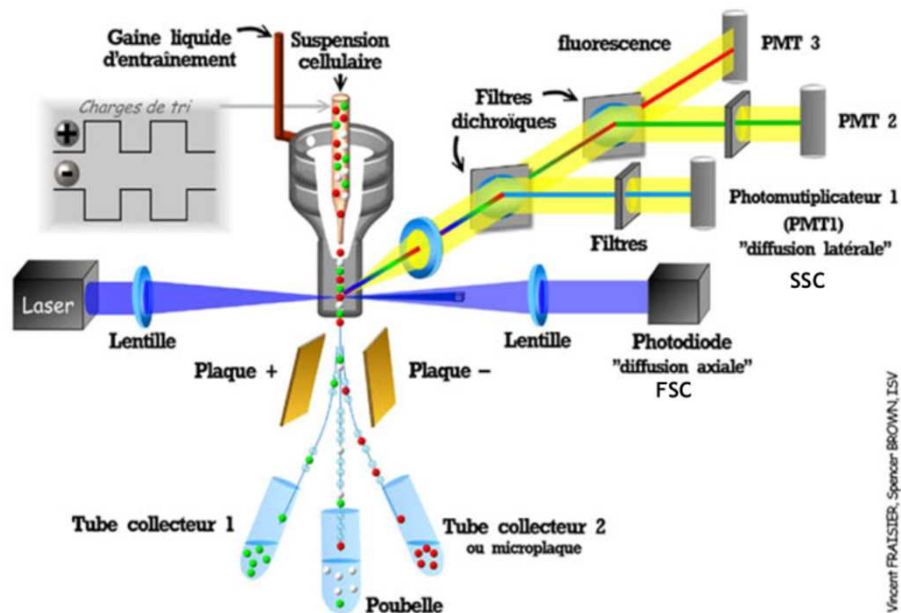


Figure 17: Représentation schématique d'un cytomètre de flux(102)

3) Description des Techniques cytofluorométriques actuelles

La première technique par cytofluorométrie en flux a été mise en place en 1989 par Van Norden. Après fixation au formaldéhyde, les cristaux de formazan, produit final de la réaction du tetrazolium bloque la fluorescence des érythrocytes. En cas d'absence de déficit en G6PD, on retrouve des cristaux de formazan dans l'érythrocyte entraînant une absence de fluorescence. L'érythrocyte déficient dépourvu de cristaux de formazan lui émet une fluorescence importante. Une analyse par ordinateur des données émises permet de distinguer les populations non fluorescentes des fluorescentes en les regroupant en 2 catégories prenant en compte le pourcentage exprimé de globule rouge par rapport au taux de fluorescence(71).

Le MRT (methemeglobin reduction test), test cytofluorométrique reprend le principe du test de cytoréduction de la méthémoglobine en oxyhémoglobine. L'échantillon est traité au préalable par du KCN (cyanure de potassium) et H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène). Après une première excitation au laser à une longueur d'onde variable puis une émission à une longueur d'onde variable, les érythrocytes contenant de l'oxyHb émettent une fluorescence contrairement aux cellules exprimant de la méthHb. Une analyse par ordinateur des données émises permet de distinguer les populations non fluorescentes des fluorescentes en les regroupant en 2 catégories prenant en compte le pourcentage exprimé de globule rouge par rapport au taux de fluorescence. Cette technique a été reprise et mise en place pour l'usage en routine chez la femme hétérozygote au CHU de ROUEN(70).

Pour ces 2 techniques, chez les femmes hétérozygotes, on distingue bien 2

faisceaux distincts séparés correspondant chacun à une population déficiente et non déficiente.

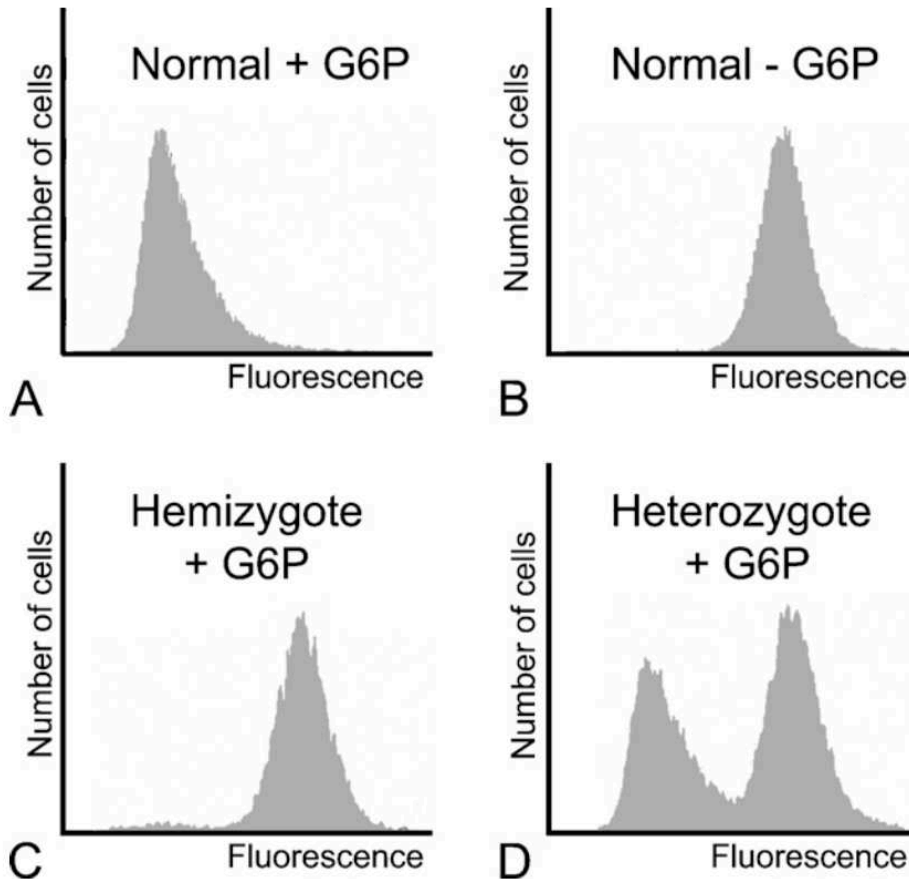


Figure 18 : Analyse par Cytométrie en flux du déficit en G6PD par technique cytochimique fondée sur la formation de formazan. (73). A patient non déficient représenté par un faible niveau de fluorescence, B témoin négatif représenté par un fort niveau de fluorescence, C patient hémizygote et D patiente hétérozygote.

Les limites de ces tests restent la complexité du pré traitement de l'échantillon et son risque d'erreur. De plus le matériel et les réactifs à acquérir sont assez coûteux et difficiles d'accès. On a aussi une durée de conservation possible du prélèvement assez courte en raison de l'effet du temps sur la dégradation du prélèvement. Chez le patient hémizygote ou femme homozygote, la possibilité d'avoir un taux d'activité enzymatique pour établir la sévérité, fait des tests spectrophotométriques une meilleure option. Une autre limite provient du fait qu'il n'est pas possible de distinguer une patiente homozygote, d'une patiente hétérozygote avec un phénotype sévère.

Toutefois, les tests cytofluorométriques sont très intéressants et une alternative crédible pour le dépistage diagnostique de la femme hétérozygote.

III- Séquençage du génome

1) Technique Sanger (103)

Initialement la technique de séquençage du génome pour la G6PD et la PK était la technique par PCR Sanger développée en 1977. Après extraction de l'ADN dans le sang prélevé sur un tube EDTA, on réalisait une amplification par PCR contenant une amorce de l'exon spécifique à tester. Dans la PCR, on rajoutait des fluorochromes spécifiques pour chaque nucléotide A (adénine), T (tyrosine), G (guanine), C (cytosine), des Didésoxynucléotides qui ont pour rôle d'arrêter l'amplification ainsi que la polymérase déclenchant la réaction. Cela créait un produit de PCR avec des millions de fragments de diverses tailles. La séquence était ensuite alignée par un électrocapillaire à partir du codon initiateur ATG qui regroupe les fragments entre eux et discrimine le nucléotide à incorporer en fonction de la couleur du fluorochrome perçu. On comparait ensuite la séquence du patient via une séquence de référence à la recherche d'une variation signalant l'existence d'un variant. Toutefois cette méthode restait fastidieuse et limitée car elle n'explorait pas les zones introniques et pouvait passer à côté des grandes délétions voire insertions.

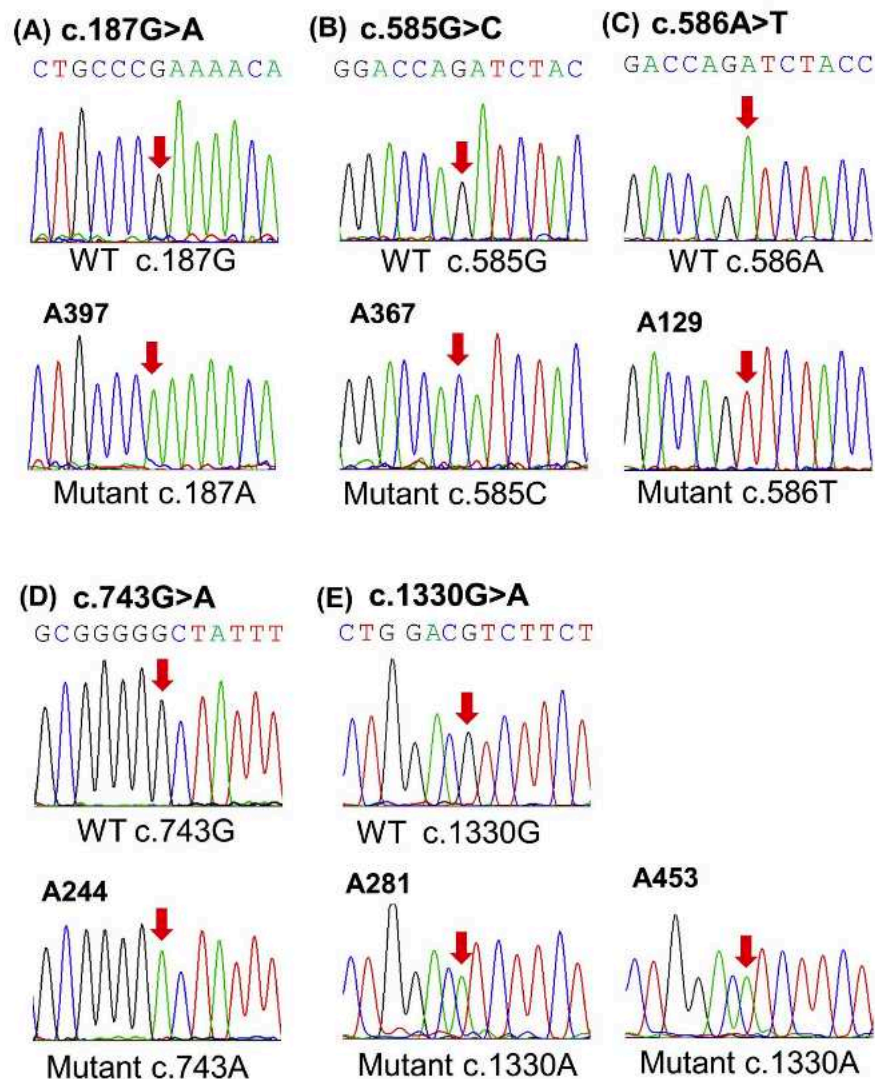


Figure 19 : Détection de variant du G6PD par technique Sanger.(104) On distingue en haut la séquence de référence avec en dessous la séquence mutée correspondant à une substitution d'un nucléotide sous forme homozygote.

2) Next Generation Sequencing (105,106)

L'arrivée du NGS (Next Generation Sequencing) a permis de résoudre ces divers problèmes par sa capacité d'analyser en parallèle des millions de fragments d'ADN comprenant une multitude de gènes. On passe tout d'abord par une pré-étape d'amplification de l'ADN par PCR puis par une étape de fragmentation par ligand à laquelle on associe des adaptateurs spécifiques de chaque fragment d'ADN. Une nouvelle phase d'amplification par PCR est réalisée où chaque fragment est associé à un cluster spécifique. On rajoute des nucléotides marqués (dNTP) puis après dénaturation, la synthèse est exécutée à partir d'une polymérase puis analysée par un séquenceur.

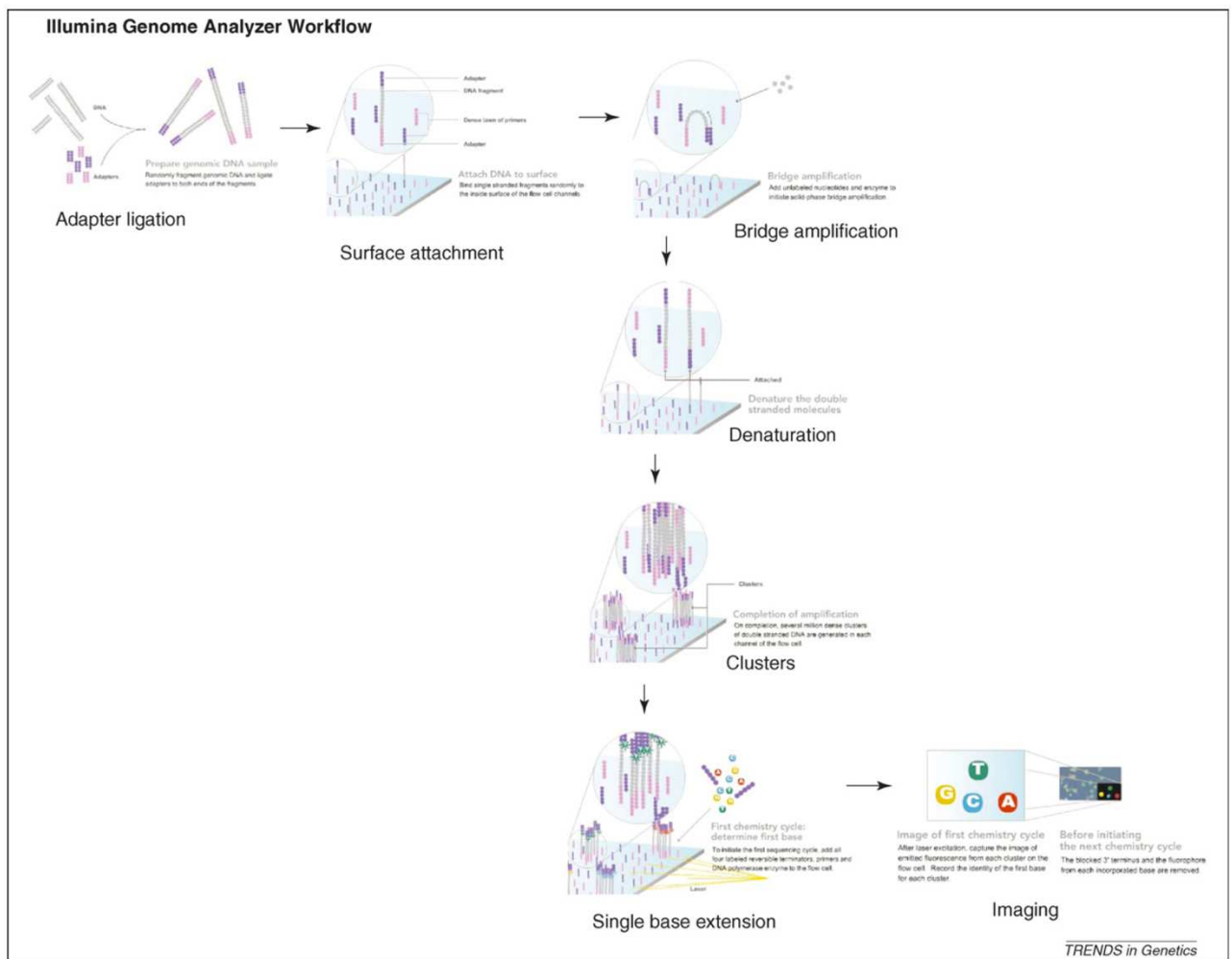


Figure 20 : Différentes étapes du NGS par technique Illumina(106)

Une analyse bio-informatique est également nécessaire afin de reconstituer les fragments en une séquence d'un gène donné à partir d'une base de données de référence. Les différentes paires de base distinctes d'un même fragment sont toutes séquencées de multiples fois permettant d'augmenter la profondeur et de déterminer la VAF (pourcentage de séquence produite avec allèle mutée / séquence avec allèle normale). Cette VAF permet de classer comme hétérozygote autour de 40 à 50 % et homozygote plus de 70% des séquences retrouvées avec la mutation.

Afin de classifier l'impact de ces variants, des logiciels de prédictions experts utilisés comme PolyPhen, MAPP et Sift permettent de donner un aperçu sur la pathogénicité ou non associée à des critères internationaux définis par l'ACMG.

Pour étudier le déficit en G6PD et en PK, le CHU de Lille utilise un panel de plusieurs gènes comprenant également les gènes de globine.

La principale limite du NGS est qu'il faut pouvoir extraire des données brutes du séquenceur, les informations pertinentes cliniquement et avoir une capacité de logiciel et stockage suffisante pour les exploiter.

Partie 3 : Comparaison entre l'activité G6PD et le ratio G6PD/PK avec pour référence la biologie moléculaire

I-Objectif de thèse

En raison des difficultés diagnostiques chez les patientes hétérozygotes déficientes en G6PD, de nombreuses méthodes et techniques évoquées ont été mises en place pour améliorer la sensibilité du diagnostic. Toutefois, ces méthodes présentent comme nous l'avons vu certaines limites.

Il est d'ailleurs reconnu que le dosage de l'activité des enzymes des globules rouges était augmenté en cas d'hémolyse, thalassémie et anémie ferriprive(33).

Du fait de la coexistence d'autres pathologies du globule rouge, Antonio Targelli dans une étude de 2004, a proposé l'utilisation d'un ratio G6PD/PK afin de mieux discriminer le déficit hétérozygote en G6PD(9).

Ce ratio a été repris au CHU de Lille avec un arbre diagnostique fondé sur ce ratio avec des seuils permettant de diagnostiquer le déficit en G6PD. Malgré cela, chez la femme, on ne peut établir avec certitude le caractère hétérozygote du déficit. Un seuil d'incertitude reste assez large allant de 0,5 à 0,8 pour lequel il y a une suspicion d'un déficit chez la femme. Dans ce cas, une biologie moléculaire en complément permet d'affirmer ou non le diagnostic.

L'objectif principal tout d'abord est de confirmer la supériorité déjà décrite dans la littérature de ce ratio par rapport au dosage enzymatique seul.

Par ailleurs on veut s'assurer que le seuil $>0,8$ établi comme concluant à une absence certaine de déficit est fiable et que l'on n'exclut pas à tort certaines patientes ayant un déficit hétérozygote en G6PD.

Ce travail a également aussi pour but d'affiner le seuil d'incertitude en essayant si possible de réduire la zone d'incertitude diagnostique.

Le dernier objectif est de trouver un seuil du ratio à partir duquel on peut conclure à un déficit en G6PD chez la femme sans avoir recours à la biologie moléculaire. Tout cela dans le but de diminuer les coûts et de raccourcir le délai de rendu des résultats pour les patients.

II-Matériel et méthodes

Il s'agit d'une étude rétrospective monocentrique chez les femmes hétérozygotes sur une période de janvier 2021 à juillet 2024.

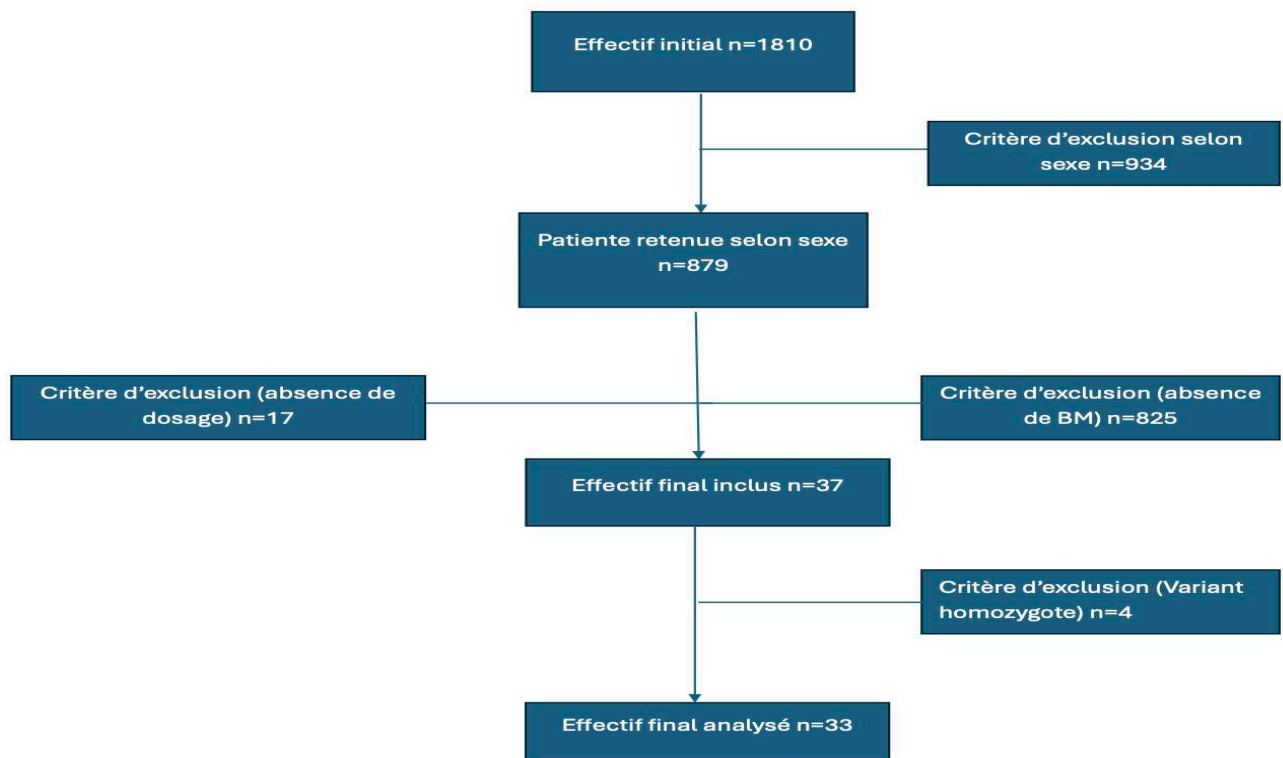


Figure 21: Diagramme de flux

Durant cette période, l'ensemble des patients ayant eu un dosage enzymatique de G6PD, PK et/ou biologie moléculaire au CHU de Lille ont été repris sur cette période. L'effectif initial était de 1810 patients.

Ainsi après avoir éliminé les prélèvements ne répondant pas aux critères d'éligibilité pour ce travail, l'effectif final analysé comprend 33 patientes avec des taux d'activité enzymatique en G6PD compris entre 0,4 et 28,4.

Parmi ces 33 patientes, 21 patientes présentaient une absence de déficit c'est-à-dire avec une biologie moléculaire sans variant retrouvé ou avec des variants considérés

comme bénins selon les critères ACMG et 12 patientes avec présence de déficit. L'âge des patientes inclus dans l'étude était compris entre 1mois et 74 ans.

Le critère d'inclusion prenait en compte les femmes de tout âge ayant réalisé un dosage enzymatique au CHU de Lille après 2021 pour laquelle une biologie moléculaire a été effectuée.

Dans les critères d'exclusion, on retrouvait :

- Les patients de sexe masculin.
- Les patientes n'ayant pas bénéficié de biologie moléculaire.
- Les patientes sans dosage enzymatique G6PD ou PK.
- Les patientes avec découverte d'un variant homozygote.

On compare le groupe G6PD par rapport au groupe G6PD/PK avec comme valeur de référence la biologie moléculaire.

Dans les données nous avons repris le taux d'activité en G6PD, le ratio G6PD/PK de chaque patiente ainsi que les résultats de biologie moléculaire avec la présence ou non de variant pathogène. Dans cette étude, la présence d'un variant pathogène est considérée en faveur d'un déficit en G6PD et l'absence ou la présence de variant bénin est considéré comme excluant le déficit en G6PD. La pathogénicité du variant est fondée sur la classification ACMG. Les différentes données ont été traitées et analysées sur le logiciel d'analyse statistique R.

III-Résultats

1) Distribution des variables

Nous avons performé un test de Shapiro-Wilk afin de vérifier la distribution des variables ratio G6PD/PK et activité de la G6PD.

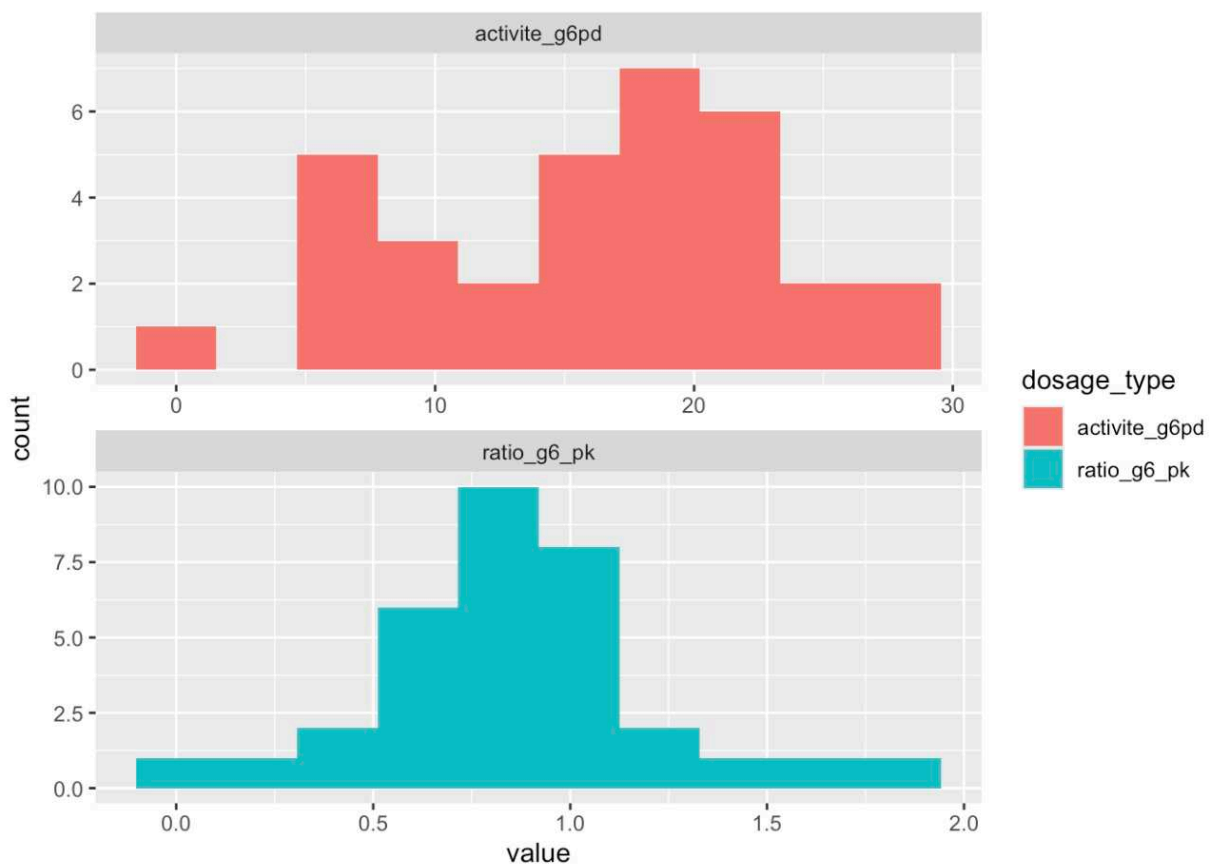


Figure 22 : Histogramme en bar vérifiant les distributions de l'activité et du ratio G6PD/PK

Les p-value de ce test sont égales à 0,6867 et 0,2539 pour le ratio G6PD/PK et l'activité de la G6PD respectivement. Les distributions suivent donc une loi normale.

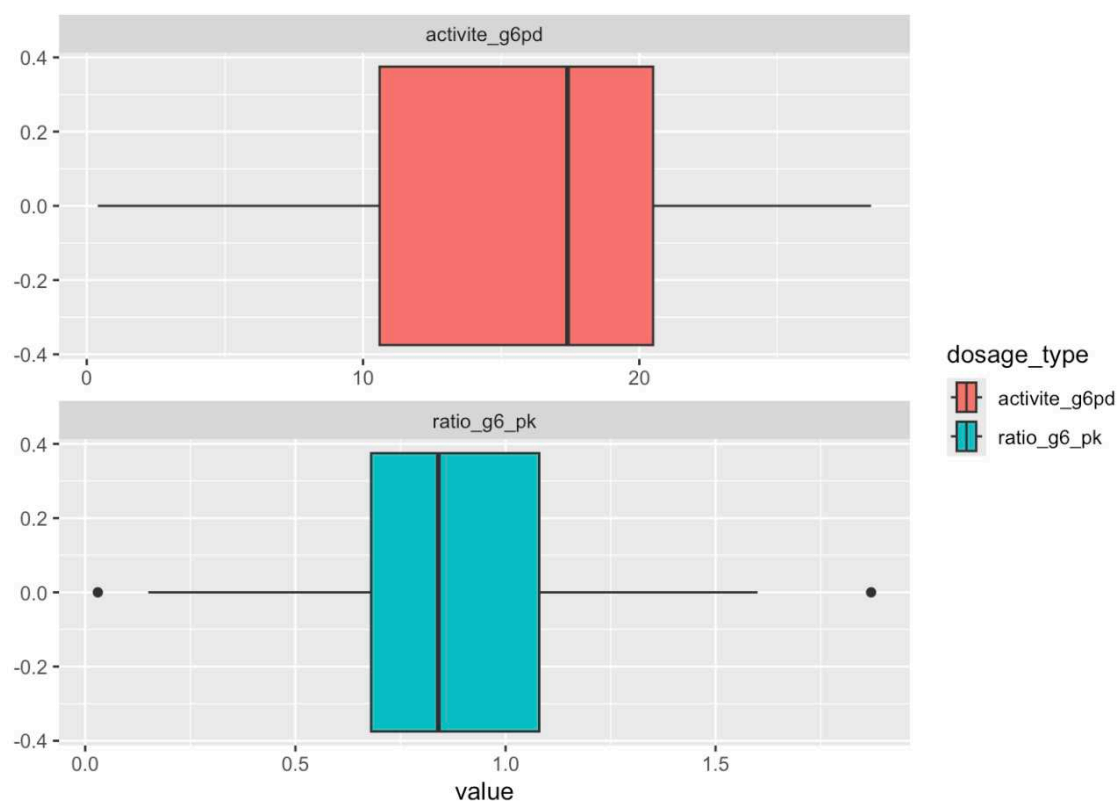


Figure 23 : Box Plot vérifiant les distributions de l'activité et du ratio G6PD/PK

Pour le dosage de l'activité de la G6PD, les valeurs s'étendent de 0,4 UI/g d'Hb à 28,4 UI/g d'Hb avec une médiane égale à 17,4 et une moyenne de 16,17.

Pour le ratio G6PD/PK, les valeurs maximales et minimales sont de 0,03 et 1,87 respectivement avec une médiane à 0,84 et une moyenne de 0,87.

2) Comparaison des mesures

Nous avons effectué une analyse bivariable avec mesure du coefficient de corrélation de Pearson.

Le coefficient de corrélation de Pearson « r » est égal à 0,64 avec une p-value égale à 0,0013.

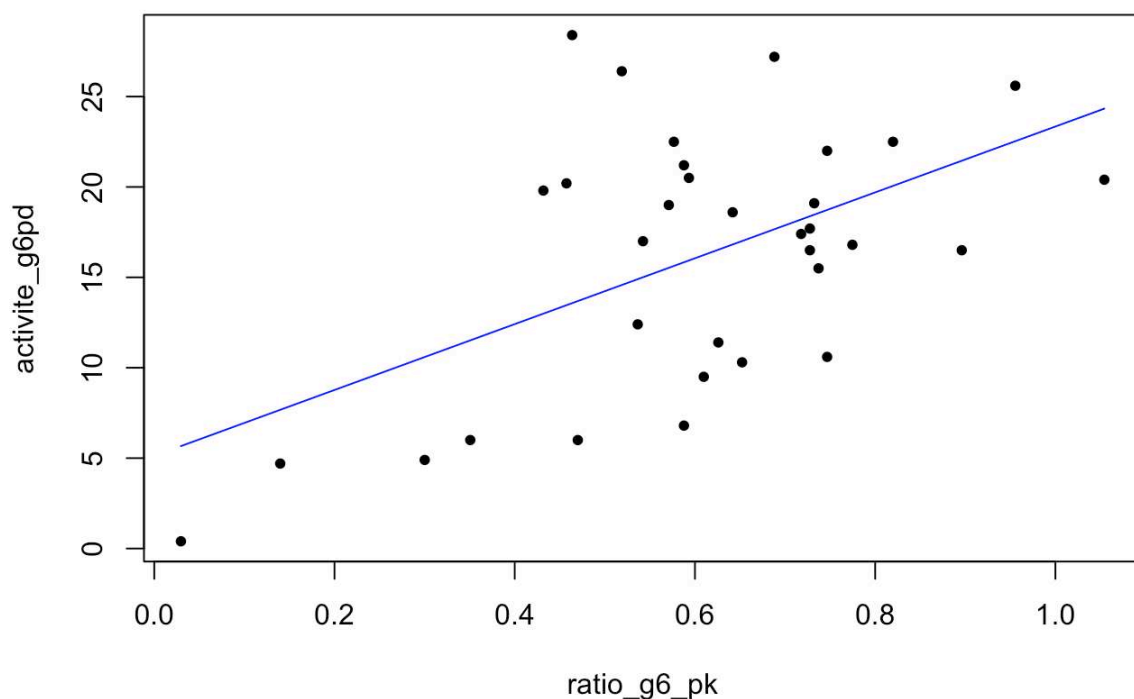


Figure 24 : Corrélation de Pearson entre l'activité et le ratio G6PD/PK

3) Comparaison à la BM

Pour faire le lien avec les résultats de biologie moléculaire. Nous avons réalisé comme méthode un test de Student comparant une variable quantitative continue à une variable qualitative au sein des groupes « Présence de déficit » et « Absence de déficit ». Les conditions de validité du test t ont été vérifiées, à savoir la normalité de la distribution, l'égalité des variables et le caractère indépendant des observations.

Les 2 groupes ont été comparés séparément aux moyennes de l'activité G6PD par le test de student puis une seconde fois aux moyennes du ratio G6PD/PK par ce même test. Une p- value <0,05 a été retenue pour définir s'il y'a une significativité au risque de 1^{ère} espèce alpha de 5%.

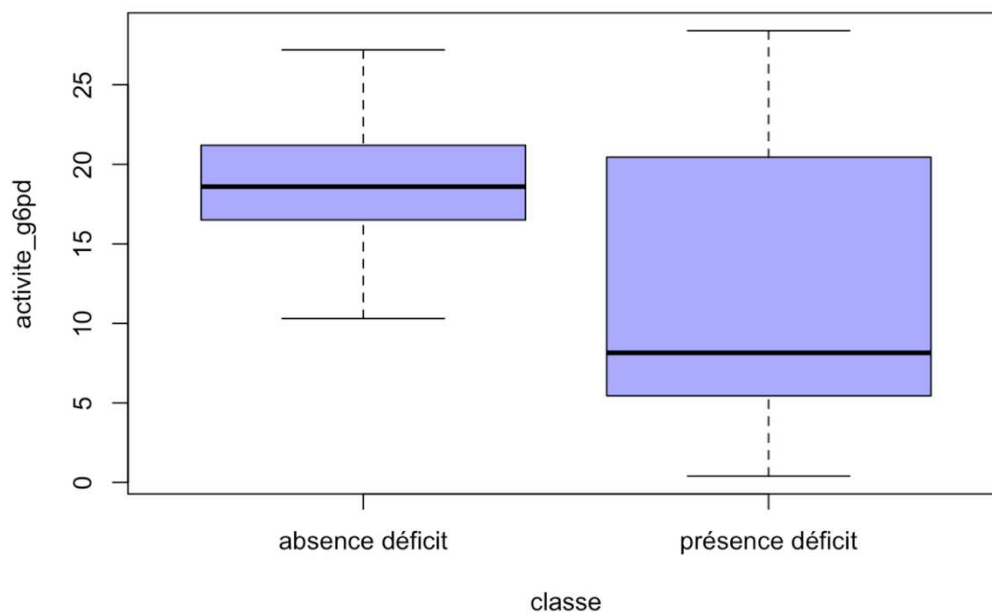


Figure 25 : Comparaison des groupes absence et présence de déficit en fonction de l'activité G6PD

Test de student entre l'activité G6PD et les 2 groupes

La valeur du test t est égal à 2,28 avec une p-value égale à 0,0378.

Dans le groupe Absence de déficit, on retrouve une moyenne à 18,49 avec un écart type moyen de 4,80 et un intervalle de confiance à 95% compris entre [16.44;20.54]

Dans le groupe Présence de déficit, la moyenne est de 12,13 avec un écart type de 8,93 et un intervalle de confiance à 95% compris entre [7.08;17.18]

Test de student entre Ratio G6PD/PK et les 2 groupes étudiés

La valeur du test t est égal à 1,86 e avec une p-value de 0,08.

Dans le groupe Absence de déficit, on retrouve une moyenne de 0,97 avec un écart type de 0,27 et un intervalle de confiance à 95% compris entre [0,85 ; 1,09]

Dans le groupe Présence de déficit, on retrouve une moyenne de 0,69 avec un écart type de 0,48 et un intervalle de confiance à 95% compris entre [0,42 ; 0,96]

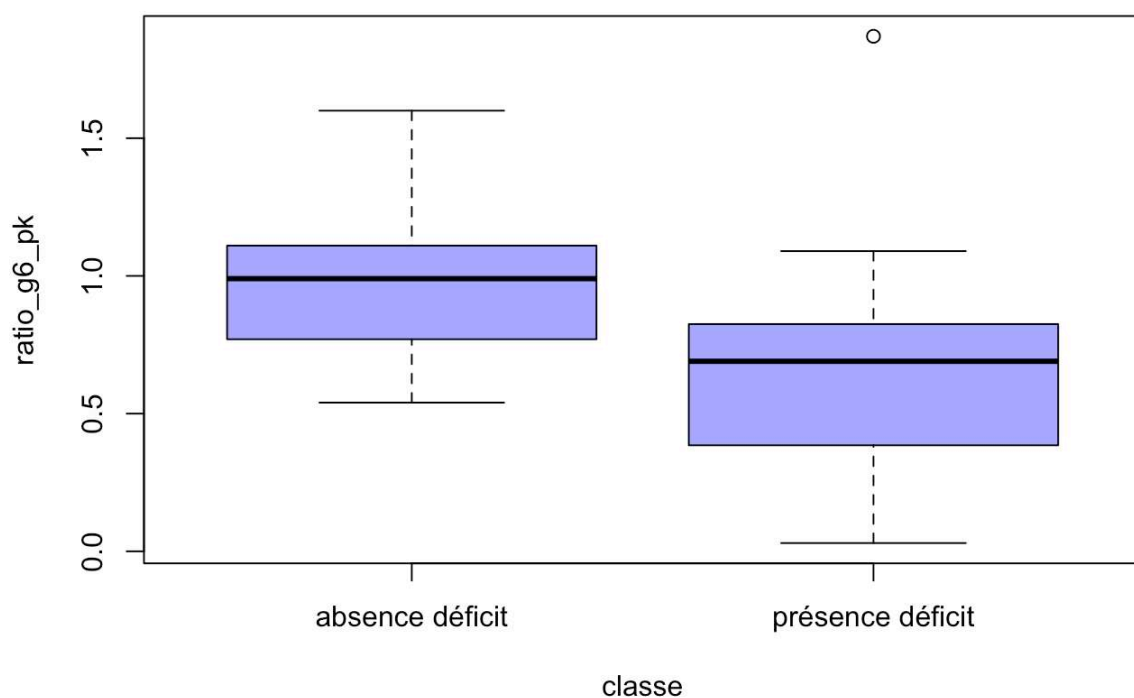


Figure 26 : Comparaison des groupes absence et présence de déficit en fonction du ratio G6PD/PK

4) Mesure des performances diagnostiques

Afin d'appréhender les performances diagnostiques de l'activité G6PD et du ratio G6PD/PK. Une analyse des courbes ROC a été effectuée, ce qui permet d'avoir une estimation de la sensibilité et de la spécificité des 2 tests ainsi que leur Aire sous la Courbe (AUC).

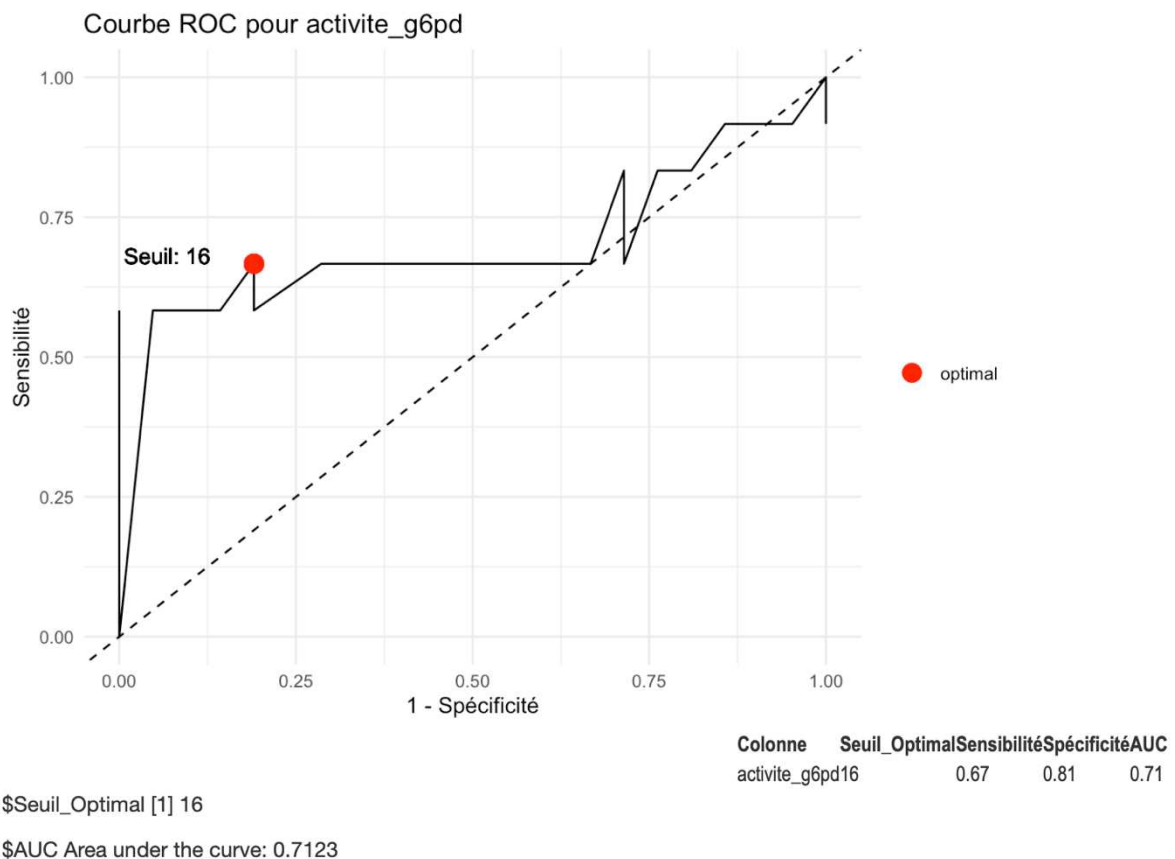


Figure 27 : Analyse ROC des résultats pour l'activité G6PD

- Pour l'activité en G6PD, on retrouve un seuil optimal à 16 avec une sensibilité estimée à 67% et une spécificité à 81%. L'AUC est de 0,71

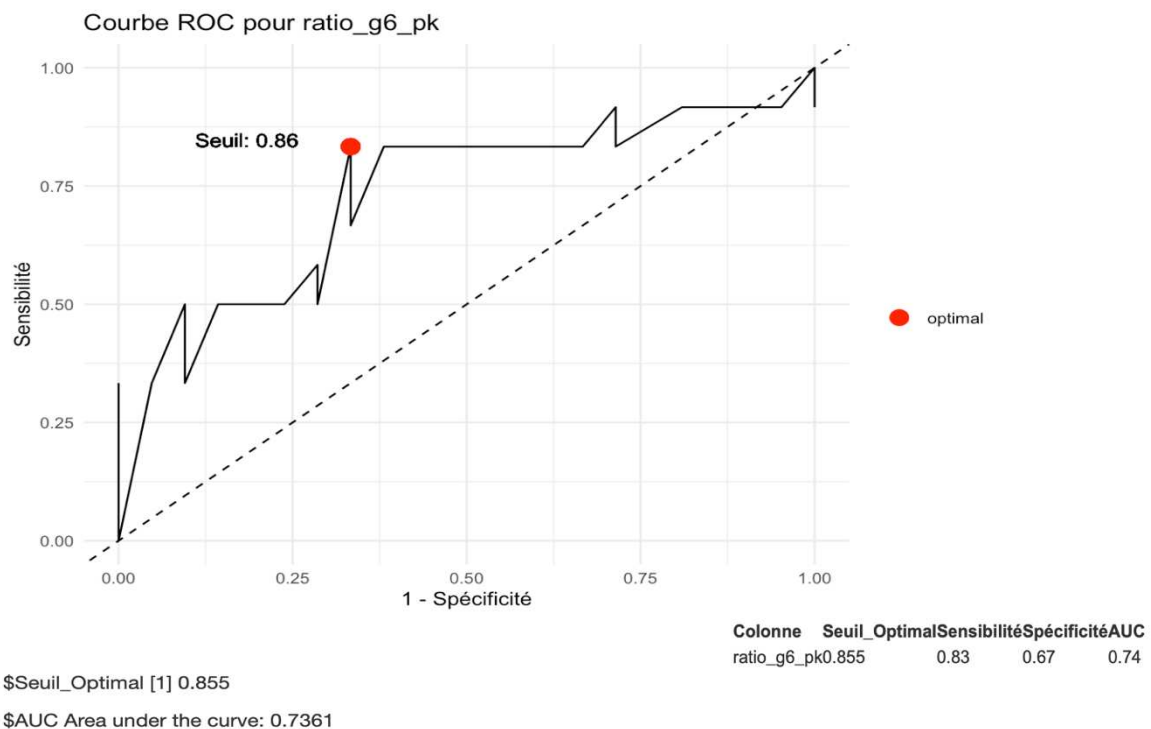


Figure 28 : Analyse ROC des résultats pour le ratio G6PD/PK

Pour le ratio G6PD/PK, on retrouve un seuil optimal à 0,855 avec une sensibilité estimée à 83% et une spécificité à 67%. L'AUC est de 0,74

5) Test de comparaison des AUC

Le test de Delong a été réalisé afin de comparer les performances diagnostiques de l'activité G6PD par rapport au ratio. Dans le but d'estimer si on retrouve une différence statistiquement significative entre les 2 méthodes.

Au total dans nos données, la valeur du test Z est égale à 0,19 avec une p-value à 0,85 et un intervalle de confiance à 0,95% compris entre -0,22 et 0,27.

IV-Discussion

1) Analyse des résultats

Les résultats mettent en évidence la difficulté de diagnostiquer un déficit en G6PD chez la femme. En effet on retrouve un phénotype extrêmement large de la population déficitaire avec comme activité enzymatique minimale 0,04 UI/g Hb soit <1% d'activité et maximale 28,4 UI/g Hb correspondant à une activité >80%. (Figure 22,23). Ces données corroborent ce qui a été décrit dans la littérature avec une variabilité extrêmement importante de l'activité enzymatique mesurée chez les femmes.

Concernant le ratio, la grande majorité de la population déficitaire est comprise entre 0,04 et 1,09 avec une valeur que l'on considère comme aberrante à 1,87. Pour la population non déficitaire, l'activité minimale retrouvée est de 10,3 UI/g Hb et un ratio de 0,54. Le test t des 2 groupes est en faveur d'une différence de moyenne significative pour l'activité en G6PD avec une p- value inférieure à 0,05 ($p=0,037$) mais non significative pour le ratio G6PD/PK ($p=0,08$). Cela peut donc faire penser que l'activité G6PD est plus discriminante que le ratio pour détecter un déficit confirmé par la biologie moléculaire. Toutefois pour l'activité comme pour le ratio, les intervalles de confiance des groupes Présence et Absence de déficit se chevauchent ce qui laisse à penser que pour l'activité, la différence peut être considérée comme faiblement significative. L'absence de différence de moyenne entre les 2 groupes pour le ratio s'explique et par la même confirme l'existence d'une zone d'incertitude diagnostique retenue par le laboratoire entre 0,5 et 0,8. D'ailleurs si l'on reprend le seuil >0,8 l'hypothèse à partir de laquelle on conclut à l'absence de déficit, 1/3 des

patientes de l'étude serait dans ce cas des faux négatifs. Ce seuil ne semble pas suffisant pour exclure avec certitude un déficit. A l'inverse, lorsqu'on analyse les 2 groupes par rapport au ratio, on constate qu'en dessous du $< 0,5$, tous les résultats sont associés uniquement au groupe déficitaire. La tendance semble démontrer qu'à partir d'un ratio à 0,5, les patientes peuvent être considérées comme déficitaires. Ce seuil est d'ailleurs celui utilisé au laboratoire pour le diagnostic positif chez les hommes.

Concernant la performance diagnostique des 2 méthodes lorsque l'on reprend les courbes ROC (figure 27,28) de l'activité et du ratio. Le ratio G6PD/PK présente une meilleure sensibilité (83%) mais une moins bonne spécificité (67%) que l'activité G6PD (sensibilité à 67% et une spécificité à 81%). La performance globale du ratio G6PD/PK est meilleure que l'activité G6PD avec une AUC = 0,736 contre 0,712 pour l'activité. Toutefois ces faibles valeurs d'AUC confirment que ces 2 méthodes ne sont pas optimales pour un usage diagnostique chez la femme. De plus, le test Delong qui compare les AUC des courbes ROC met en évidence une p-value à 0,85 élevée ce qui confirme d'un point de vue statistique qu'il n'y a pas de réelle différence de performance entre le ratio G6PD/PK et le dosage seul.

2) Principales limites de l'étude

Lorsque que l'on interprète ces résultats, il faut prendre en considération le faible effectif de l'échantillon étudié qui diminue la puissance des tests effectués et ce qui peut expliquer l'absence de réelle différence de performance entre le ratio G6PD/PK et l'activité G6PD dans le diagnostic chez la femme. Ce faible effectif s'explique par la faible utilisation de la biologie moléculaire au CHU de Lille dans l'usage en routine diagnostique chez la femme. Cela peut s'expliquer par l'absence de recommandation

internationale formelle détaillant l'utilisation de la biologie moléculaire dans le cadre exclusif du déficit en G6PD. En pratique courante, on l'utilise pratiquement exclusivement lorsque la clinique est évocatrice alors que le phénotype est discordant. Parfois la découverte du déficit apparaît de façon fortuite avec la découverte d'un variant pathogène lors de la recherche d'une autre pathologie. On peut également estimer une limite lors de la sélection des dosages pour cette étude, en effet celle-ci est ciblée sur l'utilisation de la biologie de moléculaire avec un probable biais sur la fréquence de l'association avec d'autres pathologies érythrocytaires.

L'éventuelle présence d'interférence analytique notamment l'hémolyse du prélèvement ou d'une transfusion n'a pas totalement été pris en compte. Cela peut s'expliquer d'une part par l'absence de donnée suffisante sur la possibilité d'une transfusion récente et d'autre part dans le cas de l'hémolyse, par l'absence d'un réel indice d'hémolyse ou la présence d'un biomarqueur pour la confirmer. La possibilité d'hémolyse d'un prélèvement étant considérée à partir d'une activité enzymatique supérieure à 25 dans le laboratoire.

D'ailleurs cette absence de donnée, rend difficile l'interprétation d'une valeur que l'on considère comme aberrante dans le groupe Présence de déficit avec un ratio à 1,87 pour une activité à 20,4 qui semble selon les normes du laboratoire plus évocateur d'un déficit en PK malgré la détection d'un variant A-. Deux hypothèses peuvent expliquer cette anomalie, le prélèvement a pu être effectué après une transfusion engendrant une fausse normalisation de l'activité enzymatique lors de l'analyse. Une autre possibilité serait liée au fait que le prélèvement a été réalisé chez un nourrisson

de 1 mois or durant cette période, les cellules érythrocytaires sont beaucoup plus jeunes que chez l'adulte ce qui engendre des taux d'activités enzymatiques supérieurs chez les nouveau-nés par rapport à l'adulte. Ce facteur a-t-il un impact également sur le ratio ?

Pour répondre et vérifier l'hypothèse selon laquelle l'âge a un impact sur l'activité mais aussi sur le ratio, on a repris l'ensemble des patientes pour lesquelles un dosage enzymatique et le ratio G6PD/PK ont été effectués. Les échantillons ont été classés en 3 catégories en fonction de l'âge du patient au moment du prélèvement.

Les trois catégories se distinguent comme ceci :

La première catégorie comprend tous les prélèvements effectués chez les nouveau-nés/nourrissons c'est-à-dire moins d'un an. La seconde catégorie comprend tous les prélèvements effectués chez les enfants à partir de l'âge d'1 an jusque 16 ans. La dernière catégorie comprend tous les prélèvements effectués à partir de 16 ans.

Afin de déterminer si l'hypothèse est juste, nous avons utilisé 2 fois le test d'analyse de variance d'une variable qualitative avec une variable quantitative (ANOVA) pour comparer les moyennes de l'activité en G6PD des 3 groupes puis les moyennes du ratio G6PD/PK des 3 groupes. Pour ces 2 tests, les conditions de validité (égalité des variances, taille des échantillons, normalité des tests) ont été vérifiées pour chaque groupe. Le test d'ANOVA a été complété d'une analyse de comparaison multiple de post-hoc de Tukey pour examiner d'éventuelles différences spécifiques entre les groupes.

Dans le cas de l'activité G6PD, la p- value du test est inférieure à 2×10^{-16} ce qui montre une différence significative entre les groupes d'âge avec des moyennes qui

varient très fortement. L'analyse de comparaison multiple de Tukey révèle des différences significatives entre tous les groupes, mais plus marquées entre les adultes et les nouveau-nés. Les moyennes sont respectivement pour le groupe nouveau-né de 20,25, de 18,45 pour le groupe enfant et de 13,64 pour le groupe adulte (figure 29).

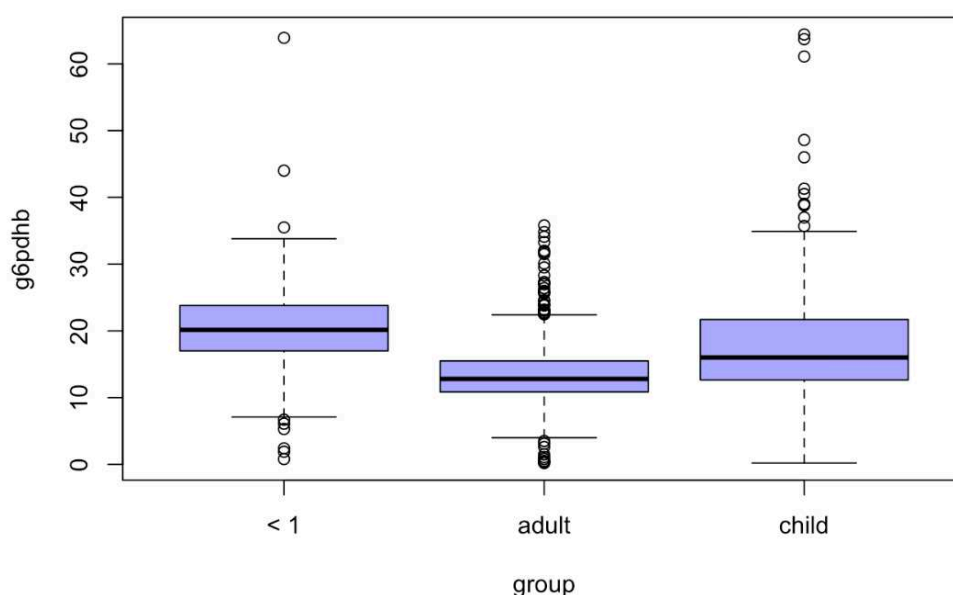


Figure 29 : Représentation de l'activité G6PD en fonction de la catégorie d'âge

Dans le cas du ratio G6PD/PK, la p-value du test ANOVA est de 0,271 ce qui indique que les différences entre les groupes ne sont pas statistiquement significatives. Le test de post-hoc Tukey n'a observé aucune différence significative entre les différents groupes d'âge. Les moyennes des groupes sont similaires avec pour le groupe nouveau-né, un ratio moyen de 1,05. Pour les 2 groupes enfant et adulte, le ratio moyen est identique à 0,99. (figure 30)

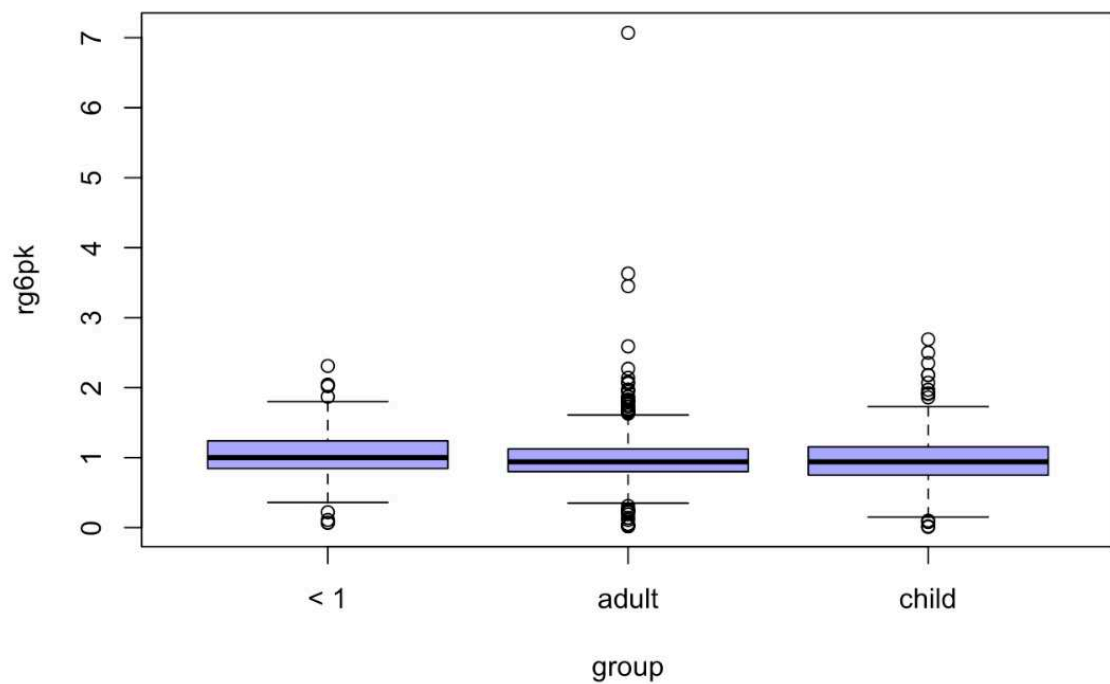


Figure 30 : Représentation du ratio G6PD/PK en fonction des catégories d'âge

Les résultats confirment l'impact de l'âge sur l'activité G6PD avec une diminution progressive durant la vie. Ce phénomène concorde avec la littérature. Au contraire, le ratio G6PD/PK n'est lui pas impacté par l'âge et ne nécessite pas de seuil d'interprétation différent pour cette variable. D'où l'intérêt d'effectuer l'interprétation des résultats par ce ratio.

3) Perspectives d'avenir

Pour confirmer les résultats préliminaires mis en évidence dans cette étude, il serait intéressant de poursuivre le recrutement en intégrant davantage de prélèvements intégrant le dosage enzymatique et la biologie moléculaire chez la femme pour pouvoir faire un lien plus précis entre le phénotype et génotype en cas de déficit en G6PD. Il faudrait également disposer d'informations sur l'éventuelle transfusion récente ayant pour risque de fausser les dosages enzymatiques et donc son interprétation. De plus la possibilité d'avoir plusieurs prélèvements enzymatiques à des périodes différentes permettrait d'éviter de passer à côté de l'hémolyse et ses impacts diagnostiques.

Conclusion :

Le diagnostic du déficit en G6PD chez les femmes hétérozygotes présente d'importantes difficultés en raison de la variabilité de l'expression enzymatique liée à l'inactivation aléatoire du chromosome X. Cette mosaïque d'expression rend les tests biochimiques classiques, comme l'activité enzymatique seule insuffisants pour établir un diagnostic positif fiable. Bien que l'activité seule puisse fournir des indications en cas de franche diminution, elle ne permet pas, à elle seule, de déterminer avec précision l'état déficient en G6PD chez les femmes hétérozygotes.

En effet, ces patientes peuvent présenter des niveaux d'activité enzymatique extrêmement variées, rendant l'interprétation des résultats complexes et une augmentation du risque de sous-estimation diagnostique. Cette incertitude diagnostique peut avoir des répercussions cliniques majeures, en particulier dans la gestion des traitements potentiellement hémolytiques.

Les résultats préliminaires ont démontré que la sensibilité du ratio semblait potentiellement meilleure que l'activité mais ne permet pas à lui seul d'obtenir un diagnostic précis de la maladie hormis pour un seuil inférieur à 0,5 ce qui correspond à une faible proportion des déficientes hétérozygotes. Par ailleurs la zone d'incertitude diagnostique préalablement définie semble plus importante qu'estimée initialement car malheureusement le seuil $>0,8$ n'exclut pas avec certitude le diagnostic.

Il est donc primordial d'intégrer des examens biologiques complémentaires en particulier les tests génotypiques par le biais de la biologie moléculaire pour les cas où l'introduction d'un traitement à risque hémolytique est indispensable. La biologie moléculaire doit également être utilisée en cas d'une discordance entre une clinique

évocatrice et les dosages afin de pallier les éventuelles limites des dosages enzymatiques. L'association entre les analyses enzymatiques et moléculaires semble à l'heure actuelle toujours la meilleure option pour identifier de manière plus précise les patientes à risque et ainsi d'obtenir une prise en charge la plus adaptée et efficace possible.

Bibliographie

1. Kim Y, Park J, Kim M. Diagnostic approaches for inherited hemolytic anemia in the genetic era. *Blood Res.* juin 2017;52(2):84-94.
2. 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;36(3):388-97.
3. Valentine WN. Hereditary hemolytic anemias associated with specific erythrocyte enzymopathies. *Calif Med.* avr 1968;108(4):280-94.
4. Arya R, Layton DM, Bellingham AJ. Hereditary red cell enzymopathies. *Blood Rev.* sept 1995;9(3):165-75.
5. Luzzatto L. Diagnosis and clinical management of enzymopathies. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 10 déc 2021;2021(1):341-52.
6. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001;79(8):704-12.
7. Gallagher PG. *Red Cell Membrane Disorders.* 2005;
8. LaRue N, Kahn M, Murray M, Leader BT, Bansil P, McGray S, et al. Comparison of Quantitative and Qualitative Tests for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Am J Trop Med Hyg.* 1 oct 2014;91(4):854-61.
9. Tagarelli A, Piro A, Tagarelli G, Bastone L, Paleari R, Mosca A. G6PD/PK ratio: a reliable parameter to identify glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency associated with microcytic anemia in heterozygous subjects. *Clin Biochem.* 1 oct 2004;37(10):863-6.
10. Stanton RC. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival. *Iubmb Life.* mai 2012;64(5):362-9.
11. Cappellini M, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The Lancet.* 5 janv 2008;371(9606):64-74.
12. Luzzatto L, Ally M, Notaro R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood.* 10 sept 2020;136(11):1225-40.
13. Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev.* sept 2007;21(5):267-83.
14. Harcke SJ, Rizzolo D, Harcke HT. G6PD deficiency: An update. *JAAPA.* nov 2019;32(11):21.
15. Beutler E. G6PD Deficiency. *Blood.* 1 déc 1994;84(11):3613-36.
16. Frank JE. Diagnosis and Management of G6PD Deficiency. *Am Fam Physician.* 1 oct 2005;72(7):1277-82.

17. Swastika M, Harahap AR, Panggalo LV, Jusman SWA, Satyagraha AW. Determining a critical threshold for G6PD activity below which red blood cell response to oxidative stress is poor. *Malar J*. 17 juin 2020;19:208.
18. Shah SS, Stone EF, Francis RO, Karafin MS. The global role of G6PD in infection and immunity. *Front Immunol*. 13 juin 2024;15:1393213.
19. Rovira A, De Angioletti M, Camacho-Vanegas O, Liu D, Rosti V, Gallardo HF, et al. Stable in vivo expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and rescue of G6PD deficiency in stem cells by gene transfer. *Blood*. 15 déc 2000;96(13):4111-7.
20. Meng Q, Zhang Y, Hao S, Sun H, Liu B, Zhou H, et al. Recent findings in the regulation of G6PD and its role in diseases. *Front Pharmacol*. 24 août 2022;13:932154.
21. Prasad AS, Tranchida L, Konno ET, Berman L, Albert S, Sing CF, et al. Hereditary sideroblastic anemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in a negro family. *J Clin Invest*. juin 1968;47(6):1415-24.
22. deficit_en_g6pd_-_pnds.pdf [Internet]. [cité 25 août 2024]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-10/deficit_en_g6pd_-_pnds.pdf
23. DelFavero JJ, Jnah AJ, Newberry D. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and the Benefits of Early Screening. *Neonatal Netw*. 1 août 2020;39(5):270-82.
24. Luzzatto L, Arese P. Favism and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. Longo DL, éditeur. *N Engl J Med*. 4 janv 2018;378(1):60-71.
25. Chu CS, Bancone G, Nosten F, White NJ, Luzzatto L. Primaquine-induced haemolysis in females heterozygous for G6PD deficiency. *Malar J*. 2 mars 2018;17:101.
26. Hernández-Ochoa B, Ortega-Cuellar D, González-Valdez A, Martínez-Rosas V, Morales-Luna L, Rojas-Alarcón MA, et al. An Overall View of the Functional and Structural Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Variants in the Mexican Population. *Int J Mol Sci*. 11 août 2023;24(16):12691.
27. Geck RC, Powell NR, Dunham MJ. Functional interpretation, cataloging, and analysis of 1,341 glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Am J Hum Genet*. 2 févr 2023;110(2):228-39.
28. Luzzatto L, Bancone G, Dugué PA, Jiang W, Minucci A, Nannelli C, et al. New WHO classification of genetic variants causing G6PD deficiency New WHO classification of genetic variants causing G6PD deficiency. *Bull World Health Organ*. 1 juill 2024;102.
29. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 10 janv 2015;385(9963):117-71.
30. Anderle A, Bancone G, Domingo GJ, Gerth-Guyette E, Pal S, Satyagraha AW. Point-of-Care Testing for G6PD Deficiency: Opportunities for Screening. *Int J Neonatal Screen*. 19

nov 2018;4(4):34.

31. Wajcman H, Galactéros F. Le déficit en glucose-6 phosphate déshydrogénase : protection contre le paludisme et risque d'accidents hémolytiques. *C R Biol.* 1 août 2004;327(8):711-20.
32. Howes RE, Piel FB, Patil AP, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, et al. G6PD Deficiency Prevalence and Estimates of Affected Populations in Malaria Endemic Countries: A Geostatistical Model-Based Map. Von Seidlein L, éditeur. *PLoS Med.* 13 nov 2012;9(11):e1001339.
33. Tagarelli A, Piro A, Bastone L, Tagarelli G. Identification of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency in a population with a high frequency of thalassemia. *FEBS Lett.* 2000;466(1):139-42.
34. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Mol Dis.* 1 mai 2009;42(3):267-78.
35. Gómez-Manzo S, Marcial-Quino J, Vanoye-Carlo A, Serrano-Posada H, Ortega-Cuellar D, González-Valdez A, et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. *Int J Mol Sci.* 9 déc 2016;17(12):2069.
36. Minucci A, Giardina B, Zuppi C, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay: How, when, and why? *IUBMB Life.* 2009;61(1):27-34.
37. Roper D, Layton M, Rees D, Lambert C, Vulliamy T, De la Salle B, et al. Laboratory diagnosis of G6PD deficiency. A British Society for Haematology Guideline. *Br J Haematol.* 2020;189(1):24-38.
38. Luzzatto L, Seneca E. G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications. *Br J Haematol.* févr 2014;164(4):469-80.
39. Boonyuen U, Chamchoy K, Swangsri T, Junkree T, Day NPJ, White NJ, et al. A trade off between catalytic activity and protein stability determines the clinical manifestations of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. *Int J Biol Macromol.* 1 nov 2017;104:145-56.
40. Lee HY, Ithnin A, Azma RZ, Othman A, Salvador A, Cheah FC. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Neonatal Hyperbilirubinemia: Insights on Pathophysiology, Diagnosis, and Gene Variants in Disease Heterogeneity. *Front Pediatr [Internet].* 24 mai 2022 [cité 25 août 2024];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/pediatrics/articles/10.3389/fped.2022.875877/full>
41. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood.* 1 janv 2008;111(1):16-24.
42. Baird K. Origins and implications of neglect of G6PD deficiency and primaquine toxicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Pathog Glob Health.* mai 2015;109(3):93-106.

43. Beutler E. G6PD: Population genetics and clinical manifestations. *Blood Rev.* mars 1996;10(1):45-52.
44. Mukherjee MB, Colah RB, Martin S, Ghosh K. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency among tribal populations of India - Country scenario. *Indian J Med Res.* mai 2015;141(5):516-20.
45. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group. *Bull World Health Organ.* 1989;67(6):601-11.
46. Gómez-Manzo S, Terrón-Hernández J, De la Mora-De la Mora I, González-Valdez A, Marcial-Quino J, García-Torres I, et al. The Stability of G6PD Is Affected by Mutations with Different Clinical Phenotypes. *Int J Mol Sci.* 17 nov 2014;15(11):21179-201.
47. Nannelli C, Bosman A, Cunningham J, Dugué PA, Luzzatto L. Genetic variants causing G6PD deficiency: Clinical and biochemical data support new WHO classification. *Br J Haematol.* 2023;202(5):1024-32.
48. Adams MJ, Ellis GH, Gover S, Naylor CE, Phillips C. Crystallographic study of coenzyme, coenzyme analogue and substrate binding in 6-phosphogluconate dehydrogenase: implications for NADP specificity and the enzyme mechanism.
49. Object object. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP +. [cité 24 août 2024]; Disponible sur: https://core.ac.uk/reader/192244315?utm_source=linkout
50. Wang XT, Chan TF, Lam VMS, Engel PC. What is the role of the second “structural” NADP+-binding site in human glucose 6-phosphate dehydrogenase? *Protein Sci Publ Protein Soc.* août 2008;17(8):1403-11.
51. Rowland P, Basak AK, Gover S, Levy HR, Adams MJ. The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. *Structure.* nov 1994;2(11):1073-87.
52. Beretta A, Manuelli M, Cena H. Favism: Clinical Features at Different Ages. *Nutrients.* 10 janv 2023;15(2):343.
53. Pahlavanzadeh M, Hekmatimoghaddam S, Teremahi Ardestani M, Ghafoorzadeh M, Aminorraaya M. G6PD Enzyme Deficiency in Neonatal Pathologic Hyperbilirubinemia in Yazd. *Iran J Pediatr Hematol Oncol.* 2013;3(2):69-72.
54. Mitra S, Rennie J. Neonatal jaundice: aetiology, diagnosis and treatment. *Br J Hosp Med.* 2 déc 2017;78(12):699-704.
55. Weng YH, Chou YH, Lien RI. Hyperbilirubinemia in healthy neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Early Hum Dev.* avr 2003;71(2):129-36.
56. Kaplan M, Hammerman C, Vreman HJ, Stevenson DK, Beutler E. Acute hemolysis and severe neonatal hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient heterozygotes. *J Pediatr.* 1 juill 2001;139(1):137-40.

57. Liu H, Liu W, Tang X, Wang T. Association Between G6PD Deficiency and Hyperbilirubinemia in Neonates: A Meta-Analysis. *Pediatr Hematol Oncol*. 17 févr 2015;32(2):92-8.
58. Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of Hyperbilirubinemia in the Newborn Infant 35 or More Weeks of Gestation. *Pediatrics*. 1 juill 2004;114(1):297-316.
59. Kaplan M, Beutler E, Vreman HJ, Hammerman C, Levy-Lahad E, Renbaum P, et al. Neonatal Hyperbilirubinemia in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-deficient Heterozygotes. *Pediatrics*. 1 juill 1999;104(1):68-74.
60. Meloni T, Forteleoni G, Noja G, Dettori G, Sale MA, Meloni GF. Increased Prevalence of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Patients with Cholelithiasis. *Acta Haematol*. 1991;85(2):76-8.
61. Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C, et al. G6PD deficiency, absence of α -thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 15 nov 2008;112(10):4314-7.
62. Relling MV, McDonagh EM, Chang T, Caudle KE, McLeod HL, Haidar CE, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for Rasburicase Therapy in the Context of G6PD Deficiency Genotype. *Clin Pharmacol Ther*. août 2014;96(2):169-74.
63. Satyagraha AW, Sadhewa A, Elvira R, Elyazar I, Feriandika D, Antonjaya U, et al. Assessment of Point-of-Care Diagnostics for G6PD Deficiency in Malaria Endemic Rural Eastern Indonesia. *PLoS Negl Trop Dis*. 19 févr 2016;10(2):e0004457.
64. Baird JK, Dewi M, Subekti D, Elyazar I, Satyagraha AW. Noninferiority of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency diagnosis by a point-of-care rapid test vs the laboratory fluorescent spot test demonstrated by copper inhibition in normal human red blood cells. *Transl Res*. juin 2015;165(6):677-88.
65. Zailani MAH, Raja Sabudin RZA, Ithnin A, Alauddin H, Sulaiman SA, Ismail E, et al. Population screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency using quantitative point-of-care tests: a systematic review. *Front Genet*. 14 juin 2023;14:1098828.
66. Fattizzo B, Cavallaro F, Marcello APML, Vercellati C, Barcellini W. Pyruvate Kinase Deficiency: Current Challenges and Future Prospects. *J Blood Med*. 1 sept 2022;13:461-71.
67. Thedsawad A, Wanachiwanawin W, Taka O, Hantaweeant C. Cut-off values for diagnosis of G6PD deficiency by flow cytometry in Thai population. *Ann Hematol*. 2022;101(10):2149-57.
68. Kalnoky M, Bancone G, Kahn M, Chu CS, Chowwiwat N, Wilaisrisak P, et al. Cytochemical flow analysis of intracellular G6PD and aggregate analysis of mosaic G6PD expression.

Eur J Haematol. 2018;100(3):294-303.

69. Anna Peters et al. Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase et paludisme : détection cytochimique de la carence hétérozygote en G6PD chez les femmes [Internet]. [cité 13 juin 2024]. Disponible sur: <https://journals.sagepub.com/doi/epub/10.1369/jhc.2009.953828>
70. Kapadia AB, Sharma P, Jain K, Sachdeva MUS, Bose PL, Gupta M, et al. Evaluation of a flow cytometric test for G6PD-deficient erythrocytes. Trop Med Int Health. 2021;26(4):462-8.
71. Van Noorden CJ, Dolbeare F, Aten J. Flow cytofluorometric analysis of enzyme reactions based on quenching of fluorescence by the final reaction product: detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in human erythrocytes. J Histochem Cytochem. 1 sept 1989;37(9):1313-8.
72. Peters AL, Van Noorden CJF. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency and Malaria: Cytochemical Detection of Heterozygous G6PD Deficiency in Women. J Histochem Cytochem. nov 2009;57(11):1003-11.
73. Banccone G, Kalnoky M, Chu CS, Chowwiwat N, Kahn M, Malleret B, et al. The G6PD flow-cytometric assay is a reliable tool for diagnosis of G6PD deficiency in women and anaemic subjects. Sci Rep. 29 août 2017;7:9822.
74. Arbres-decisionnels-globaux_V.2024_19_07_final.pdf [Internet]. [cité 25 août 2024]. Disponible sur: https://filiere-mcgre.fr/wp-content/uploads/2024/07/Arbres-decisionnels-globaux_V.2024_19_07_final.pdf
75. ANPGM_137-Pathologies_du_globule_rouge.pdf [Internet]. [cité 25 sept 2024]. Disponible sur: https://filiere-mcgre.fr/wp-content/uploads/2019/06/ANPGM_137-Pathologies_du_globule_rouge.pdf
76. Garcia AA, Koperniku A, Ferreira JCB, Mochly-Rosen D. Treatment Strategies for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency: Past and Future Perspectives. Trends Pharmacol Sci. oct 2021;42(10):829-44.
77. Schormann N, Hayden KL, Lee P, Banerjee S, Chattopadhyay D. An overview of structure, function, and regulation of pyruvate kinases. Protein Sci Publ Protein Soc. oct 2019;28(10):1771-84.
78. Grace RF. Pyruvate kinase activators for treatment of pyruvate kinase deficiency. Hematol Am Soc Hematol Educ Program. 8 déc 2023;2023(1):97-106.
79. ENEGELA OA, ANJUM F. Pyruvate Kinase Deficiency. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cité 29 mai 2024]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560581/>
80. Miwa S. Recommended Methods for the Characterization of Red Cell Pyruvate Kinase Variants. Br J Haematol. 1979;43(2):275-86.

81. Al-Samkari H, Galactéros F, Glenthøj A, Rothman JA, Andres O, Grace RF, et al. Mitapivat versus Placebo for Pyruvate Kinase Deficiency. *N Engl J Med*. 13 avr 2022;386(15):1432-42.
82. Mattevi A, Valentini G, Rizzi M, Speranza ML, Bolognesi M, Coda A. Crystal structure of *Escherichia coli* pyruvate kinase type I: molecular basis of the allosteric transition. *Structure*. juill 1995;3(7):729-41.
83. Bianchi P, Fermo E, Glader B, Kanno H, Agarwal A, Barcellini W, et al. Addressing the diagnostic gaps in pyruvate kinase deficiency: Consensus recommendations on the diagnosis of pyruvate kinase deficiency. *Am J Hematol*. janv 2019;94(1):149-61.
84. Secrest MH, Storm M, Carrington C, Casso D, Gilroy K, Pladson L, et al. Prevalence of pyruvate kinase deficiency: A systematic literature review. *Eur J Haematol*. août 2020;105(2):173-84.
85. Grace RF, Barcellini W. Management of pyruvate kinase deficiency in children and adults. *Blood*. 10 sept 2020;136(11):1241-9.
86. Terzian C, Biémont C. Les théories de l'effet fondateur, Mayr, et la génétique des populations. *Génétique Sélection Évolution*. 1988;20(1):111-22.
87. Peter BM, Slatkin M. The effective founder effect in a spatially expanding population. *Evol Int J Org Evol*. mars 2015;69(3):721-34.
88. Luke N, Hillier K, Al-Samkari H, Grace RF. Updates and advances in pyruvate kinase deficiency. *Trends Mol Med*. mai 2023;29(5):406-18.
89. Bianchi P, Fermo E. Molecular heterogeneity of pyruvate kinase deficiency. *Haematologica*. 23 juill 2020;105(9):2218-28.
90. Zanella A, Bianchi P, Fermo E. Pyruvate kinase deficiency. *Haematologica*. 1 juin 2007;92(6):721-3.
91. Bianchi P, Fermo E, Lezon-Geyda K, van Beers EJ, Morton HD, Barcellini W, et al. Genotype-phenotype correlation and molecular heterogeneity in pyruvate kinase deficiency. *Am J Hematol*. mai 2020;95(5):472-82.
92. Structure and Function of Human Erythrocyte Pyruvate Kinase - *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. [cité 25 sept 2024]. Disponible sur: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)66766-9/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)66766-9/fulltext)
93. Gilsanz F, Vega MA, Gómez-Castillo E, Ruiz-Balda JA, Omeñaca F. Fetal anaemia due to pyruvate kinase deficiency. *Arch Dis Child*. nov 1993;69(5 Spec No):523-4.
94. 210.full.pdf [Internet]. [cité 26 sept 2024]. Disponible sur: <https://jpet.aspetjournals.org/content/jpet/380/3/210.full.pdf>
95. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, Löhr GW, Ramot B, Valentine WN. International Committee for Standardization in Haematology: Recommended Methods for Red-Cell

- Enzyme Analysis. Br J Haematol. 1977;35(2):331-40.
96. Les composants d'un spectrophotomètre - Labster [Internet]. [cité 28 sept 2024]. Disponible sur: <https://theory.labster.com/fr/spec-components/>
97. Beutler E. A Series of New Screening Procedures for Pyruvate Kinase Deficiency, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency, and Glutathione Reductase Deficiency. Blood. 1 oct 1966;28(4):553-62.
98. Thielemans L, Gornsawun G, Hanboonkunupakarn B, Paw MK, Porn P, Moo PK, et al. Diagnostic performances of the fluorescent spot test for G6PD deficiency in newborns along the Thailand-Myanmar border: A cohort study. Wellcome Open Res. 2 janv 2018;3:1.
99. Halim SA, Bahar R, Abdullah WZ, Zon EM, Yusoff SM. Performance Comparison Between Conventional Fluorescent Spot Test and Quantitative Assay in Detecting G6PD Deficiency in Neonates. Oman Med J. 31 juill 2023;38(4):e524.
100. Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS. Methaemoglobin reduction test. Bull World Health Organ. 1960;22(6):633-40.
101. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. Curr Protoc Immunol. 21 févr 2018;120:5.1.1-5.1.11.
102. Principe de fonctionnement du cytomètre de flux — Site des ressources d'ACCES pour enseigner les Sciences de la Vie et de la Terre [Internet]. [cité 27 sept 2024]. Disponible sur: <https://accres.ens-lyon.fr/accres/logiciels/applications/winmdi/cytometr.htm>
103. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc. nov 2020;32(6):767-75.
104. Chiu YH, Liu YN, Chen HJ, Chang YC, Kao SM, Liu MY, et al. Prediction of functional consequences of the five newly discovered G6PD variations in Taiwan. Data Brief. 11 juin 2019;25:104129.
105. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends Genet. mars 2008;24(3):133-41.
106. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? Arch Dis Child - Educ Pract Ed. déc 2013;98(6):236-8.

AUTEUR :	Nom : TOUSSE	Prénom : Denys
Date de soutenance :	23 octobre 2024	
Titre de la thèse : Évaluation de l'efficacité du ratio G6PD/PK dans le diagnostif positif du déficit en G6PD chez les femmes hétérozygotes au CHRU de Lille		
Thèse-Médecine-Lille 2024		
Cadre de classement : <i>Biologie médicale</i>		
DES + spécialité: <i>Biologie Médicale</i>		
Mots-clés : G6PD, PK, ratio G6PD/PK		

Contexte : Le déficit en G6PD est le déficit enzymatique héréditaire le plus fréquent et connu dans monde. Toutefois il reste une difficulté majeure de diagnostic chez les femmes déficitaires hétérozygotes en G6PD avec un risque de sous-évaluation diagnostique. Pour y pallier, un ratio a été mis en place fondé sur les données de la littérature prenant en compte le taux d'activité en G6PD et en PK. L'objectif de ce travail est d'évaluer la pertinence de ce ratio chez la femme en le mettant en lien avec le génotypage de la G6PD.

Méthode : Il s'agit d'une étude rétrospective monocentrique sur une période de 2021 à juillet 2024. Nous avons repris l'ensemble des prélèvements pour lequel l'activité G6PD, le ratio G6PD/PK et la biologie moléculaire ont été effectué conjointement dans le laboratoire. Dans cette étude, la présence d'un variant pathogène est considérée en faveur d'un déficit en G6PD et l'absence ou la présence de variant bénin est considéré comme excluant le déficit en G6PD. Les performances de l'activité et du ratio ont été évalué de manière statistique à partir de la concordance de leurs résultats avec la biologie moléculaire.

Résultats : L'analyse du test t student de comparaison de moyenne des 2 groupes absence et présence de déficit par rapport à l'activité G6PD et le ratio G6PD/PK ainsi que la comparaison des 2 courbes ROC de l'activité et du ratio montrent des performances quasiment identiques chez la femme hétérozygote entre les 2 tests diagnostiques.

Conclusion : Le ratio G6PD/PK ne semble pas à lui seul être suffisant pour poser un diagnostic chez les femmes hétérozygotes. L'utilisation de la biologie moléculaire à partir d'un seuil supérieur à 0,5 paraît nécessaire pour éliminer avec certitude la pathologie.

<u>Composition du jury:</u>		
Président :	Monsieur le Professeur Nicolas POTTIER	
Assesseurs :	Monsieur le Docteur François LOISELEUR	
	Monsieur le Docteur Benjamin CARPENTIER	
Directeur de thèse :	Monsieur le Docteur Patrice MABOUDOU	