



MERCREDI 14
& JEUDI 15 MAI
2025

Diagnostic des déficits enzymatiques du globule rouge

Victor BOBEE-SCHNEIDER
Laboratoire d'Hématologie
CHU de Rouen

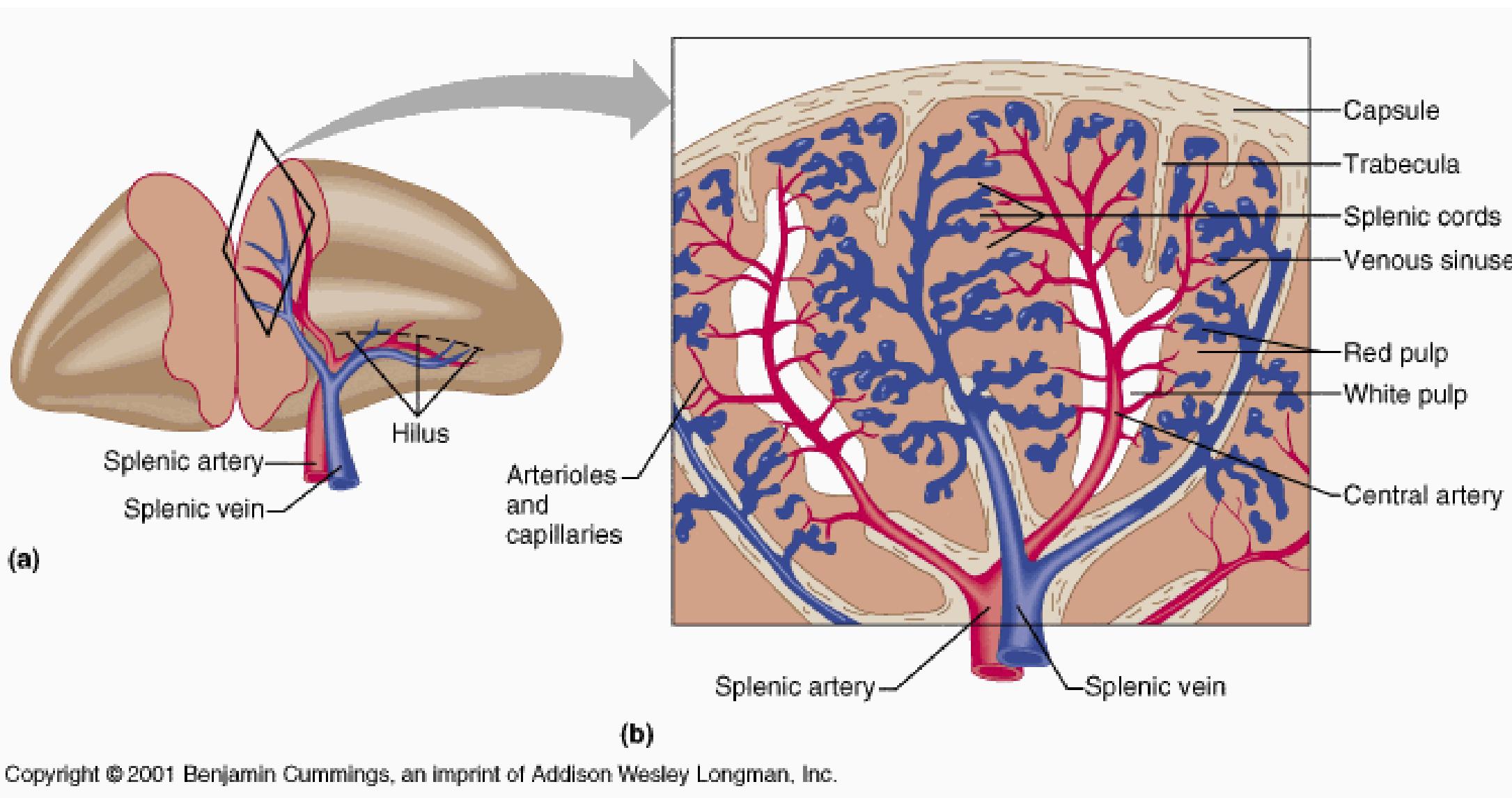


Survie du globule rouge

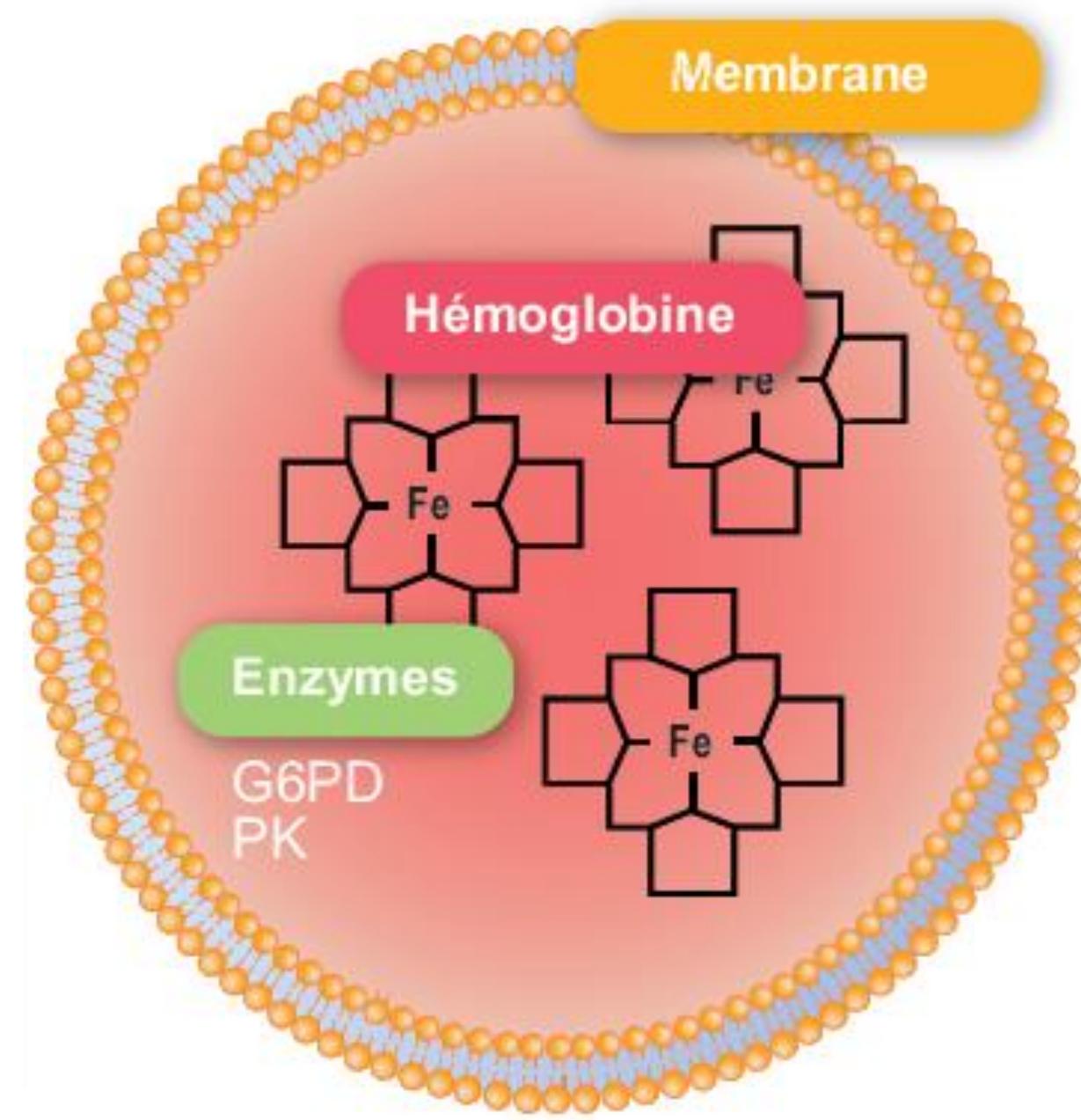
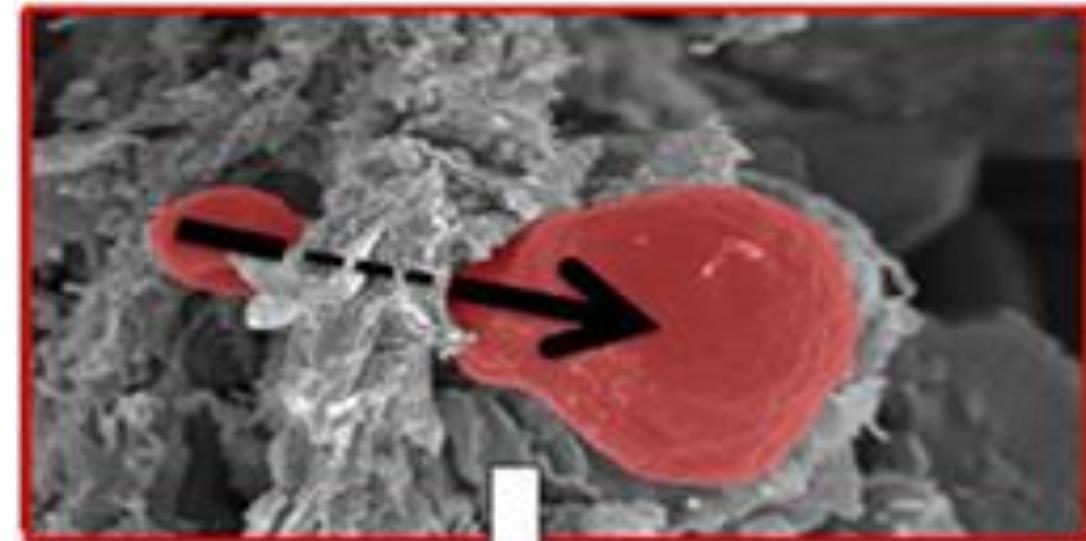
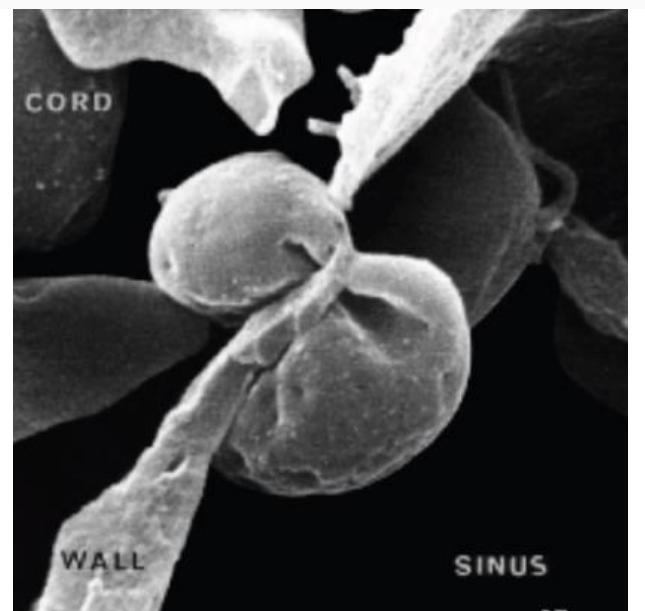
Physiologie

- Circulation périphérique pendant **120 jours**
- Passe **14 000 fois** dans la rate

Cordons spléniques aux sinus spléniques



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.



Métabolisme du GR

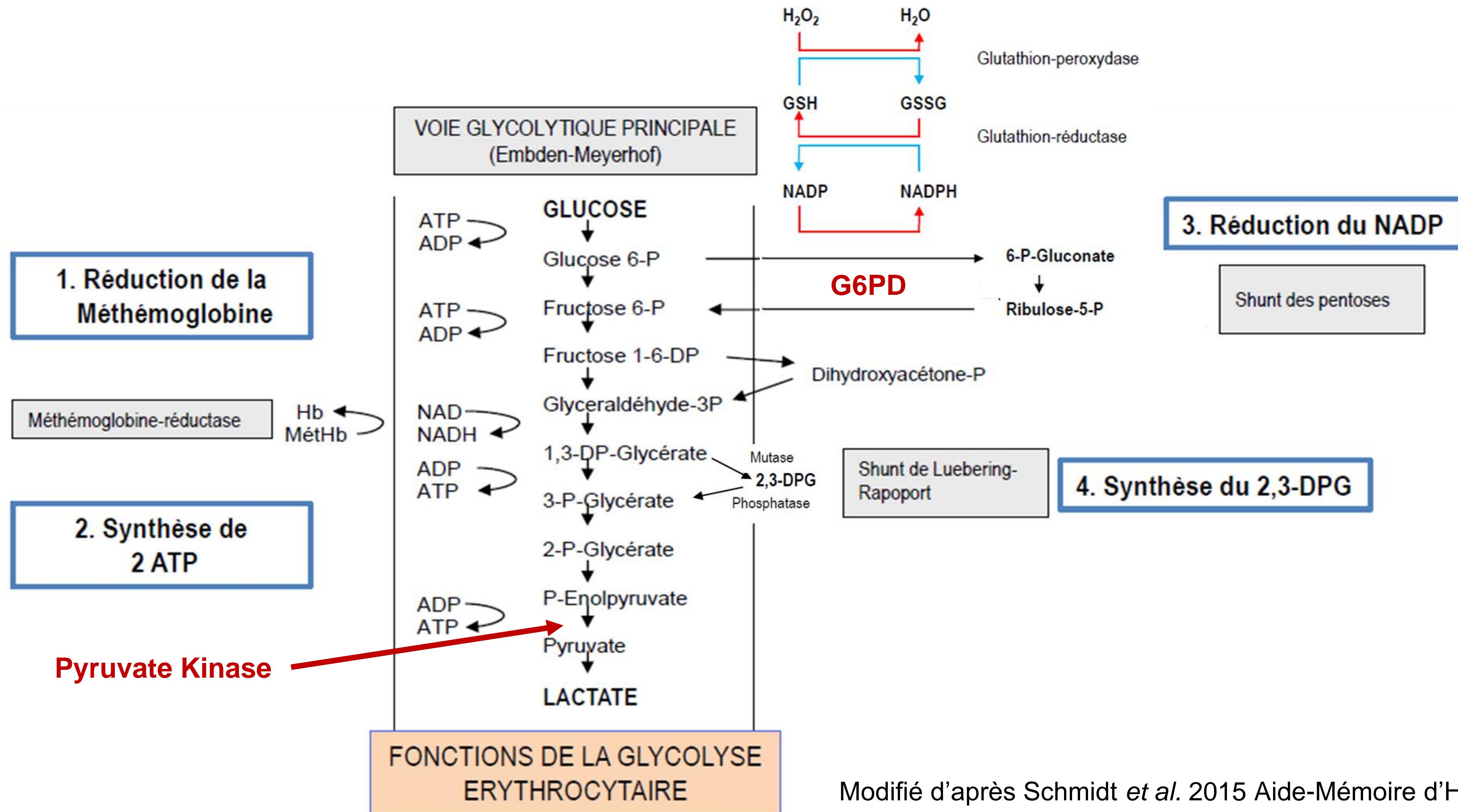
GR
« jeunes »

120 jours

Cellule anucléée

GR
« âgés »

Les métabolismes du GR



Modifié d'après Schmidt et al. 2015 Aide-Mémoire d'Hématologie

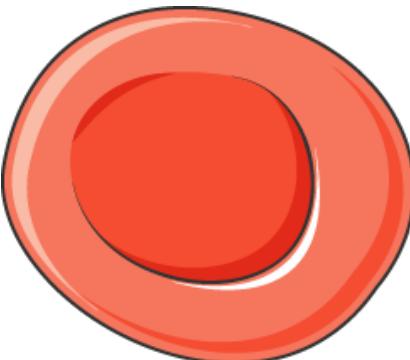
Déficit en Pyruvate Kinase

Très rare

Environ 1 cas pour 20 000 habitants

Anémie hémolytique chronique congénitale

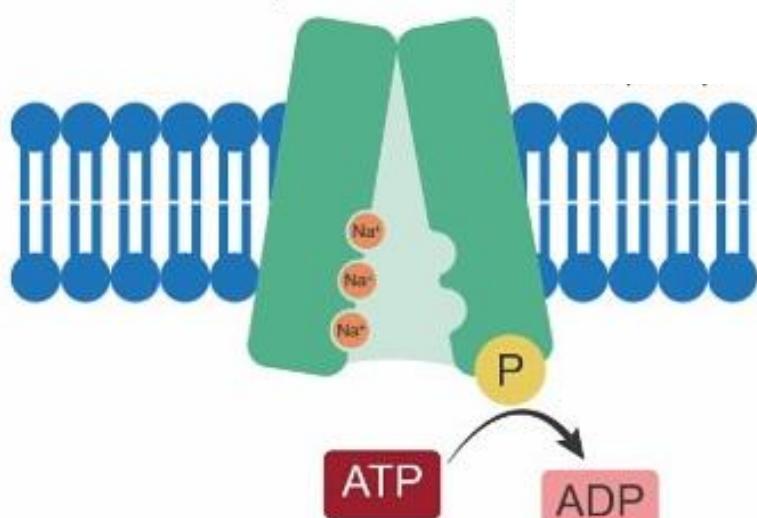
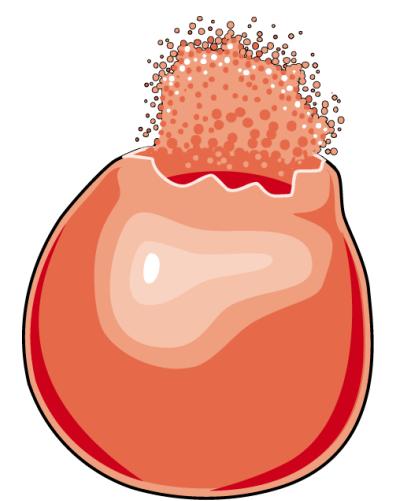
Début néonatal le plus souvent



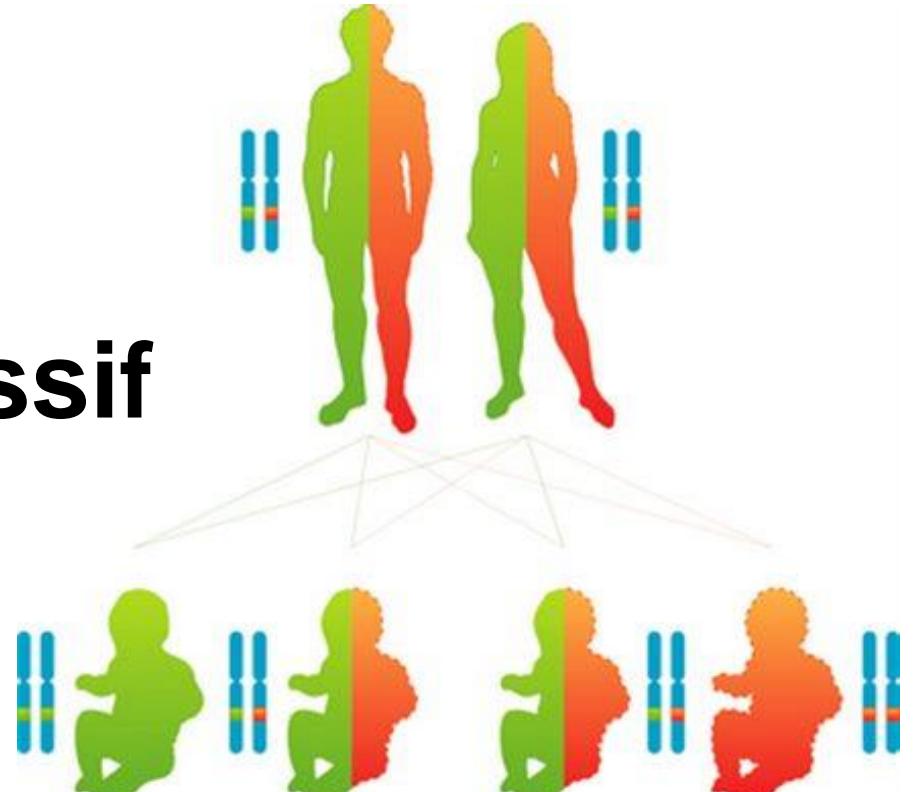
Déficit en ATP

Anomalie pompes membranaires

↓ Fluidité de la membrane



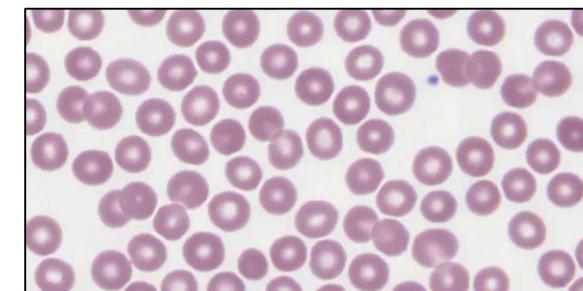
Récessif



Hémogramme

Tendance macrocytaire

Hyper-réticulocytose franche



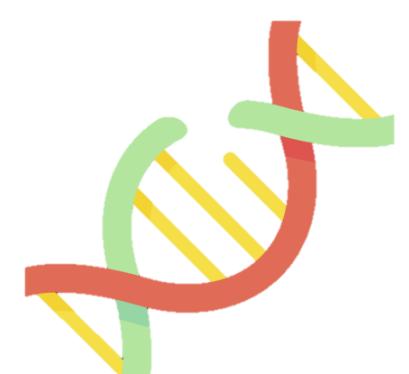
Frottis sanguin

Sans particularités

Clinique

Ictère, Splénomégalie, Lithiases

Surcharge en fer



Prise en charge

Spicafoldine, Vaccinations

Splénectomie

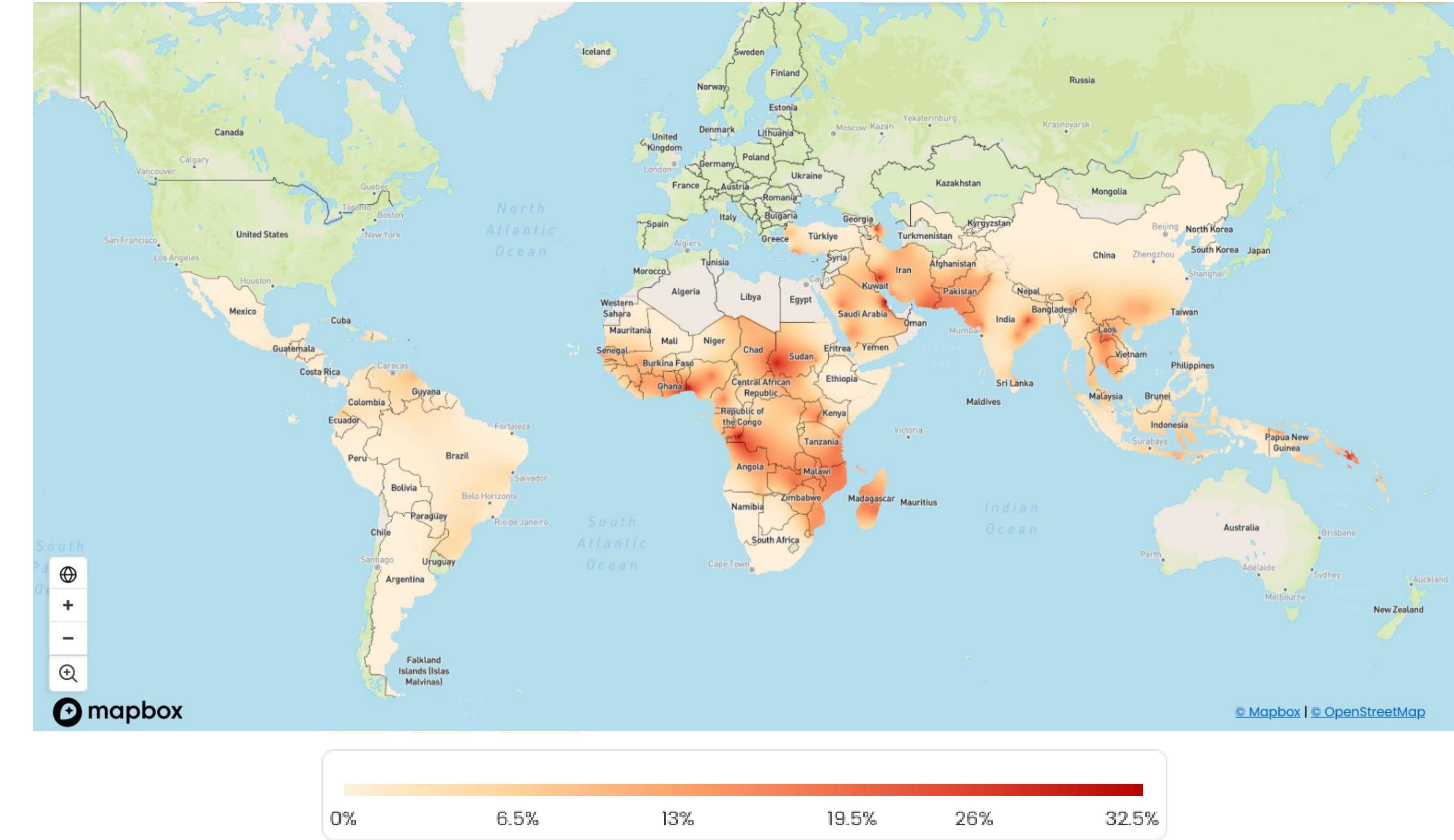
Activateurs de la PK

Déficit en G6PD

Très fréquent

>400 millions d'individus dans le monde
Moyen-Orient, Afrique, Asie...

Transmission liée à l'X

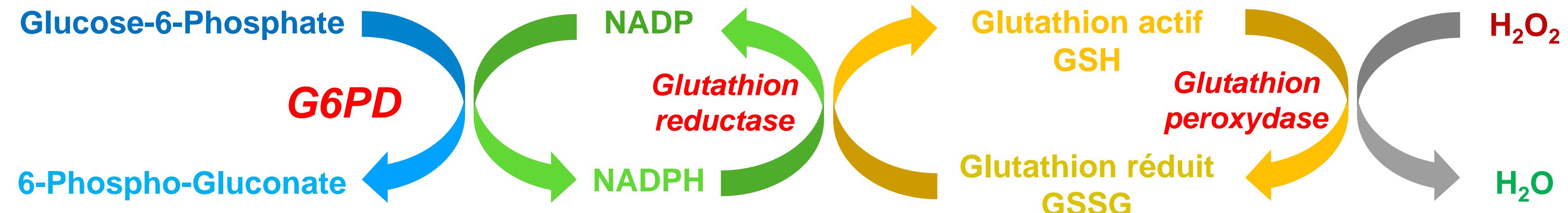


Lyonisation
Inactivation aléatoire d'un chromosome X

Déficit en G6PD

Ictère néonatal
Accès d'hémolyse aigue

après exposition à un facteur déclenchant



Etat basal : Hémogramme normal

Anémie hémolytique chronique rarissime

- ⇒ Doit faire exclure les autres causes d'hémolyses chroniques
- ⇒ Indication à une étude moléculaire du gène G6PD

Les facteurs déclenchants

Aliments

- Fèves
- Boissons contenant de la Quinine
- Ne pas dépasser 1 g/j de Vitamines C



Médicaments

- Primaquine
- Nitrofurantoïne
- Sulfamides
- Bactrim
- Dapsone / Disulone
- Rasburicase



Autres

- Infection
- Acidocétose diabétique
- Exposition au henné
- Poppers
- Boules anti-mites

Dérivés nitrés
Naphtalène



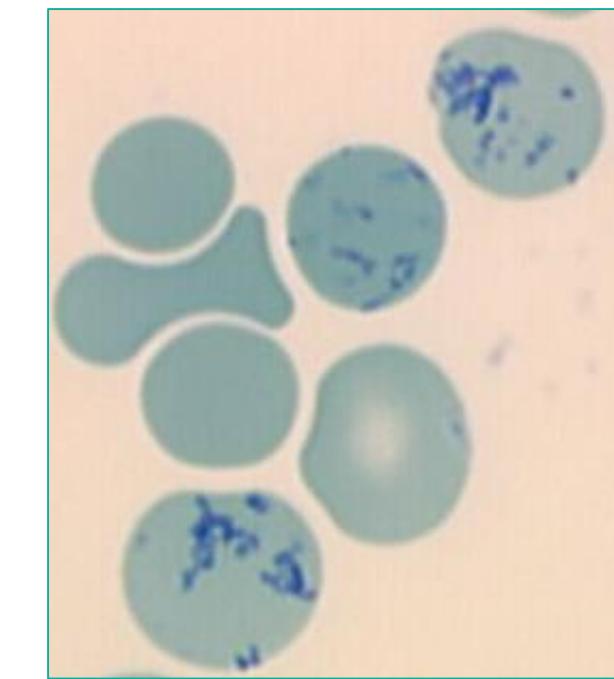
Accès d'hémolyse aigue G6PD-

Anémie aigue

Profondeur variable

Normocytaire / Tendance macrocytaire

Hyper-réticulocytose



Frottis sanguin

Le plus souvent sans particularités

Rarement **Hemighosts**

Signes d'hémolyse intravasculaire

LDH ↑

Haptoglobine ↓ ↓ ↓

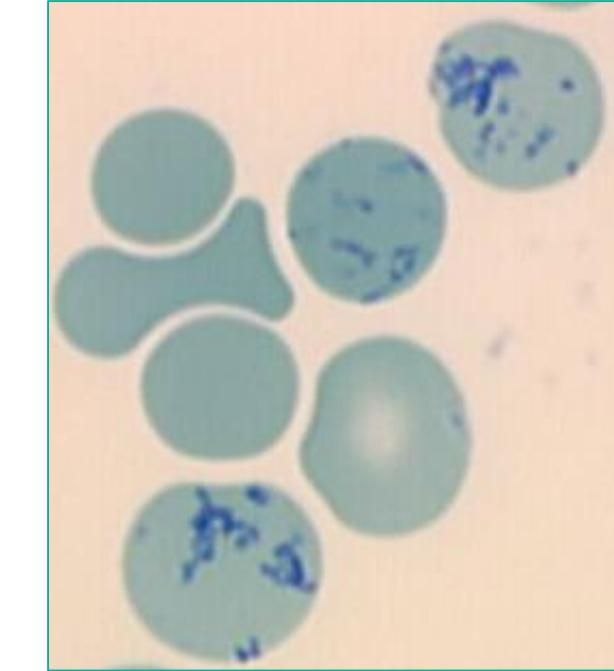
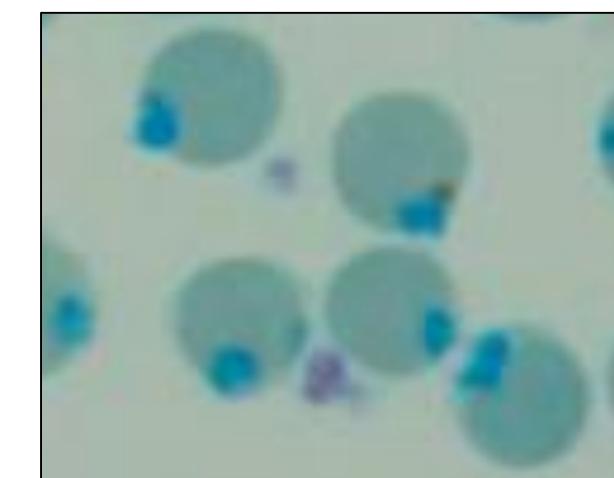
Insuffisance rénale aigue

Asthénie / Ictère

Hémoglobinurie

Uries « Porto » / « Coca-cola »

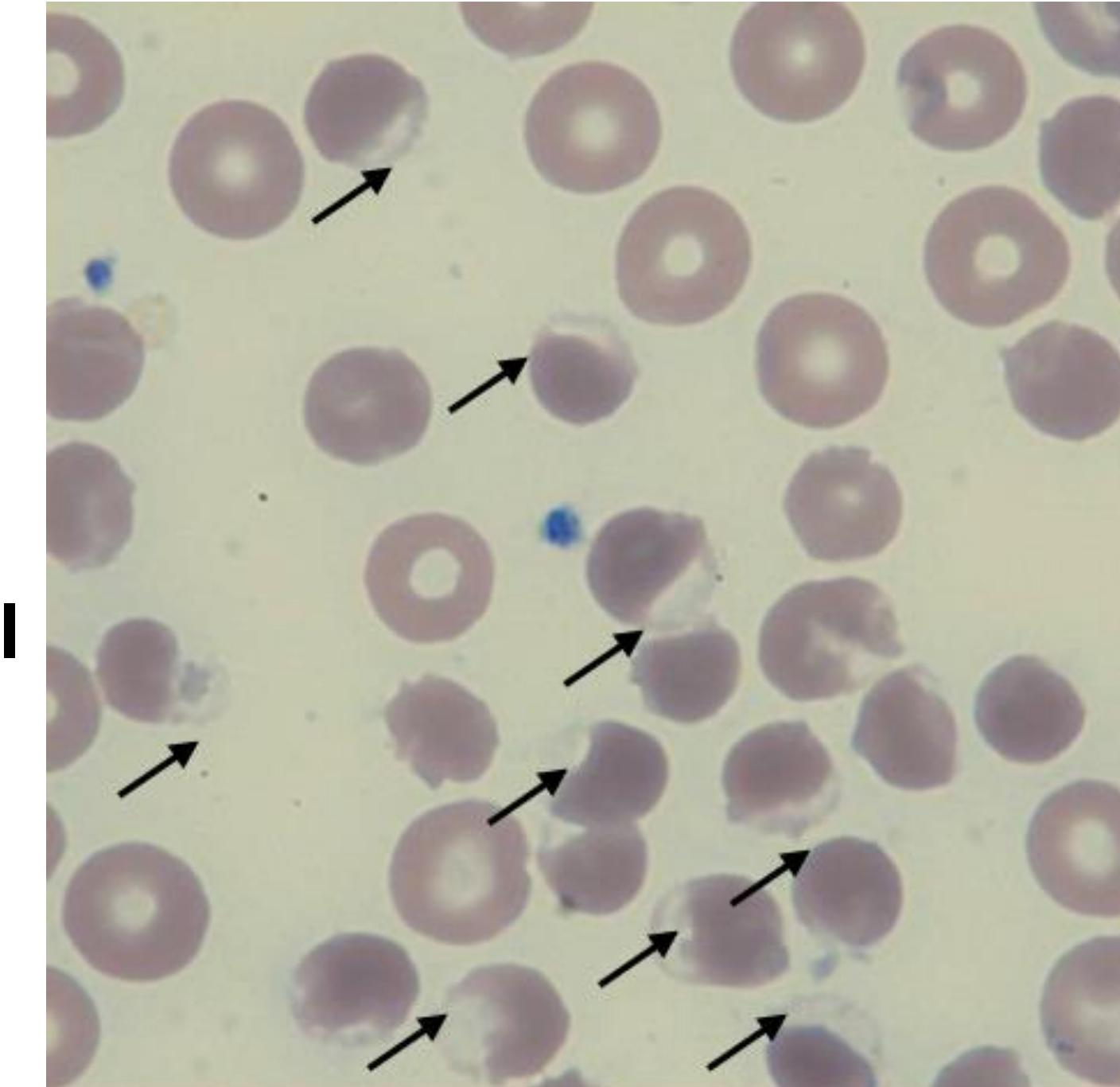
Douleurs abdominales/lombaires atypiques



Réticulocytes

Bleu de crésyl

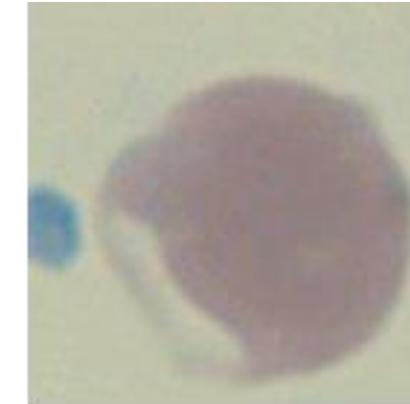
Corps de Heinz



Hématie partiellement vidée de son contenu : zone « fantôme »

Membrane irrégulière / stress oxydatif

Spécifique d'un accès d'hémolyse chez un patient avec un déficit en G6PD



Conseils aux patients G6PD-

Liste de médicaments contre-indiqués

Auto-médication **déconseillée**

Paracétamol, Aspirine **autorisés** en respectant les posologies

Connaitre les règles hygiéno-diététiques

Fruits et jus de fruits **autorisés**

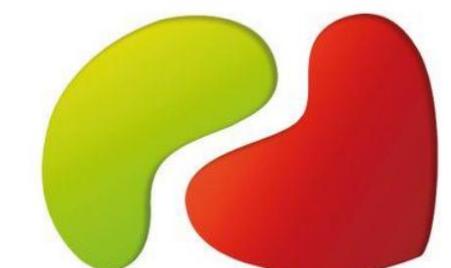
Savoir reconnaître les signes d'une hémolyse aigue

Vaccinations à jour

Carte de soins et d'urgence



FILIÈRE SANTÉ MALADIES RARES

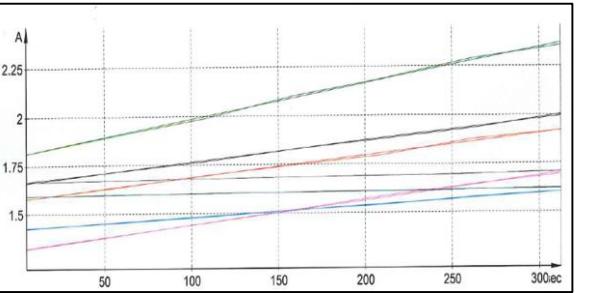


Vigifavisme

Association française des personnes atteintes du déficit en G6PD

Diagnostic des déficits enzymatiques du GR

Activités enzymatiques par Spectrophotométrie



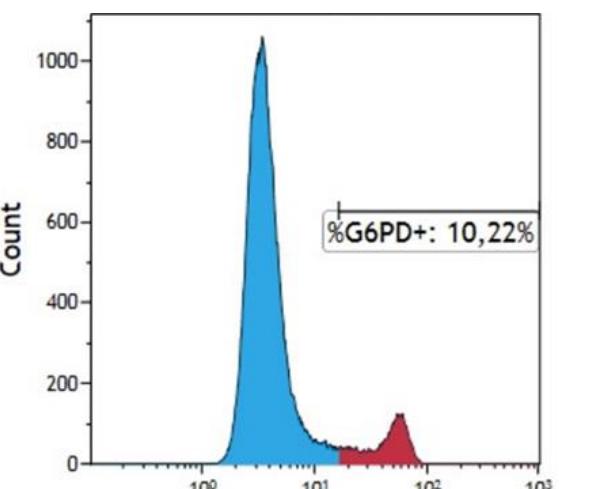
Quelques jours

Etude moléculaire du gène G6PD / PK-LR



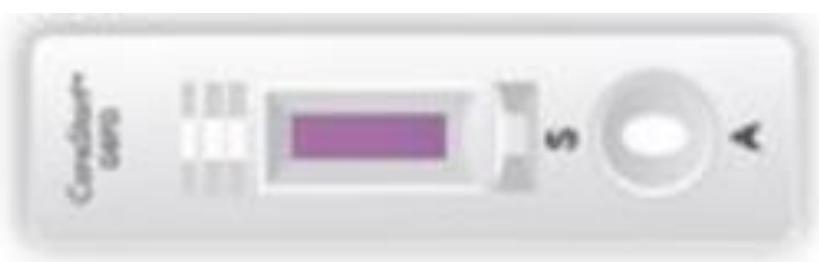
Quelques mois

Recherche de déficit en G6PD par CMF



Quelques jours

Point-Of-Care G6PD



Quelques minutes

Point-Of-Care G6PD

Résultats qualitatifs

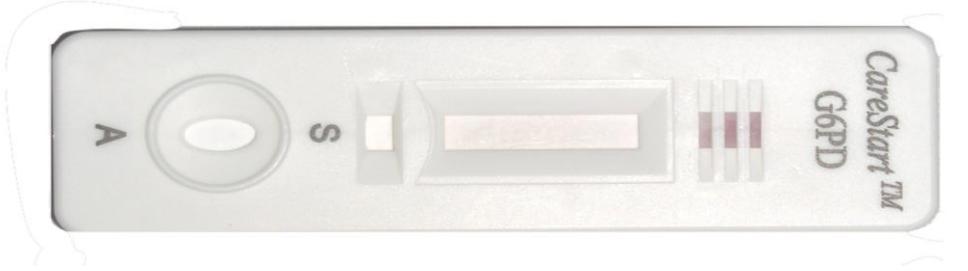
Binaxnow G6PD



Se = 55%
Sp = 100%

Osorio et al. 2015
Am. J. Trop. Med. Hyg.

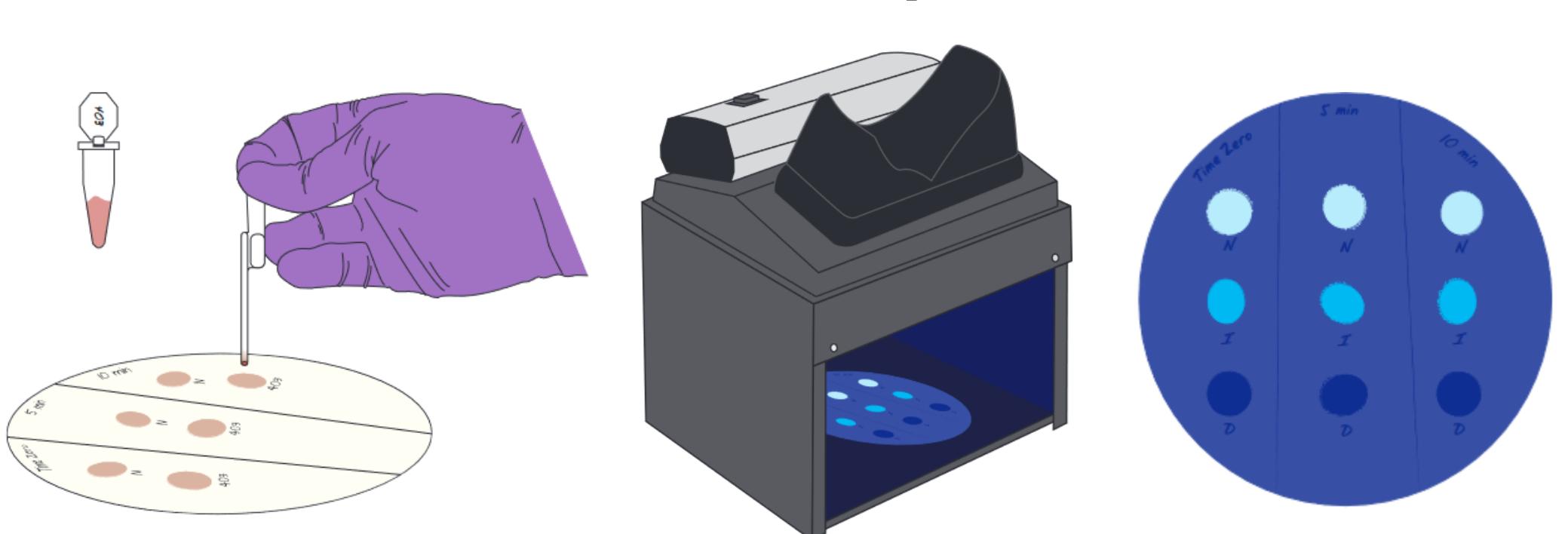
Carestart G6PD



Se = 68%
Sp = 100%

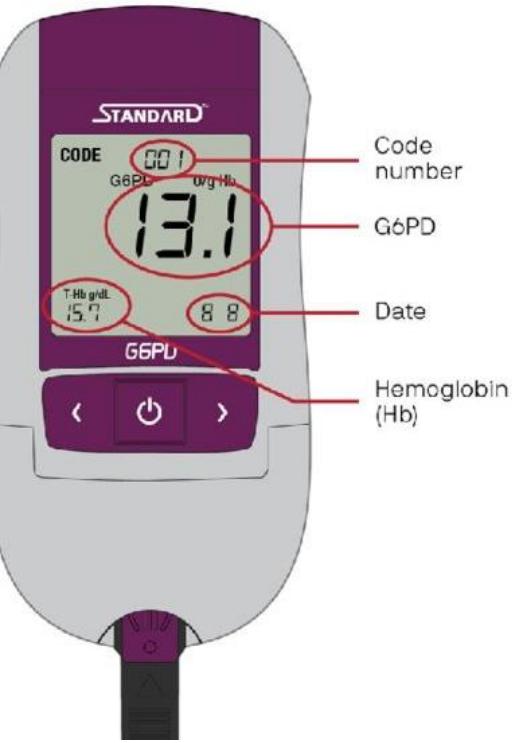
Kim et al. 2011 *Plos One*

Fluorescence Spot Test



Résultats quantitatifs

SD Biosensor

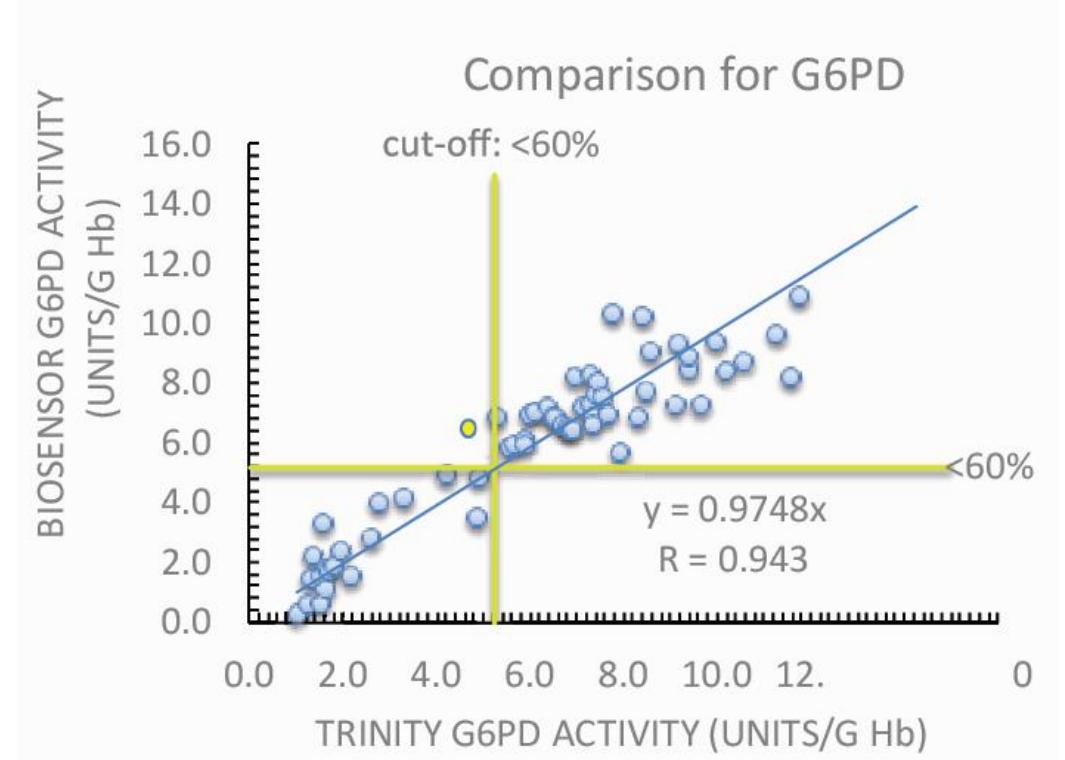


Méta-analyse
>2000 patients

Se >95%
Sp >90%

Camilo Martinez et al. 2024
Malaria Journal

Carestart Biosensor



Activités enzymatiques par Spectrophotométrie

A distance de toute transfusion

Apport de GR normaux risque de masquer un déficit



ACD
+4°C

Acide
Citrate
Dextrose

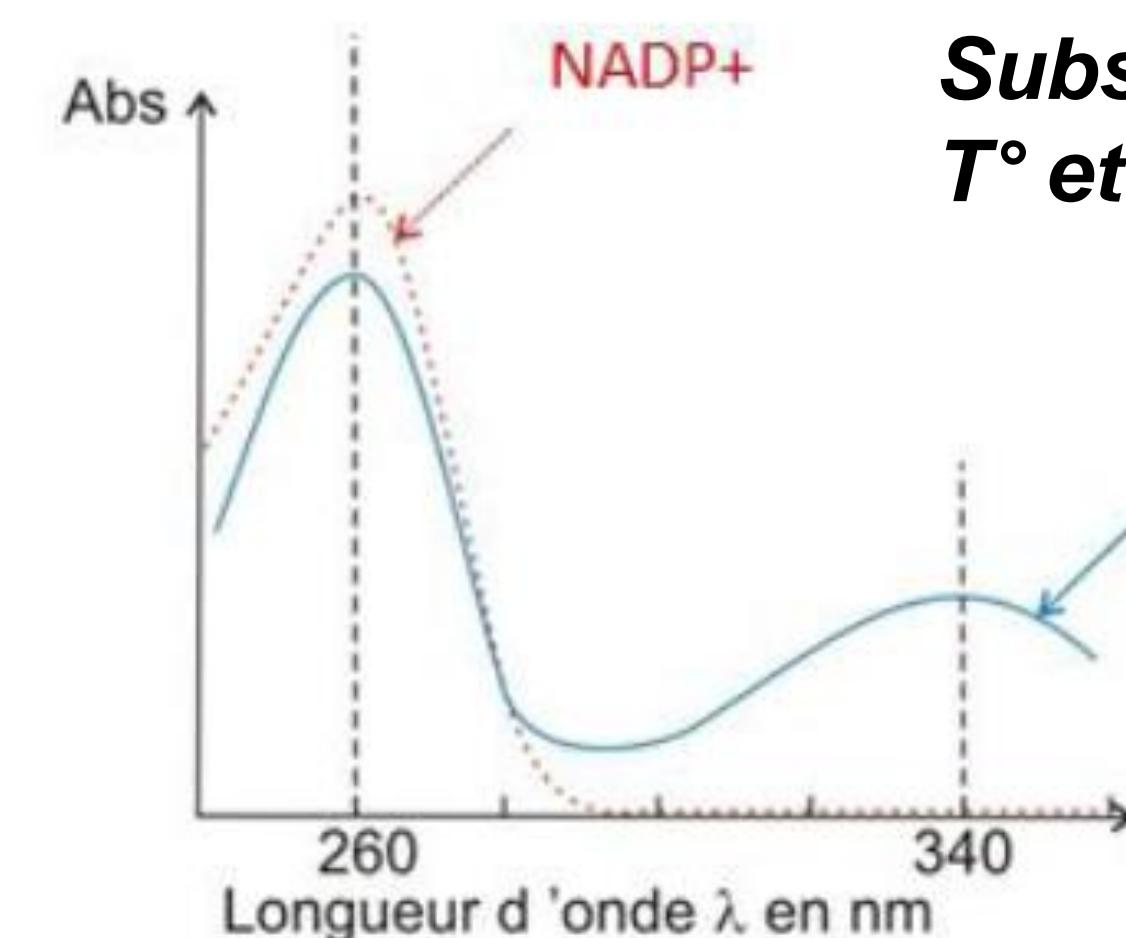
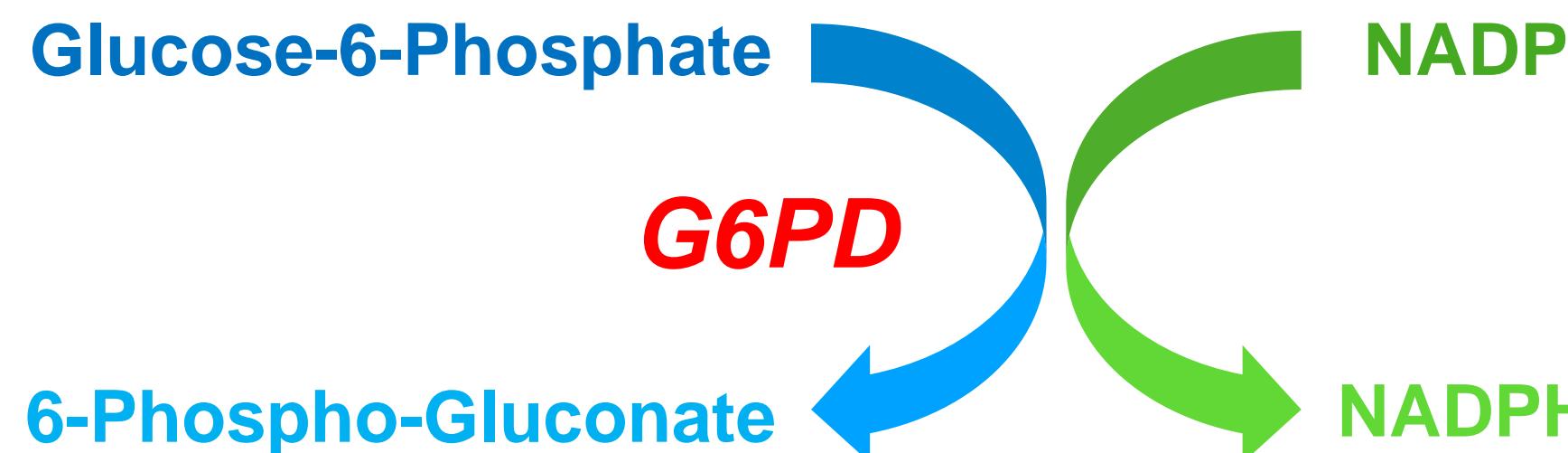


EDTA
+4°C

A partir d'un culot de Globules Rouges

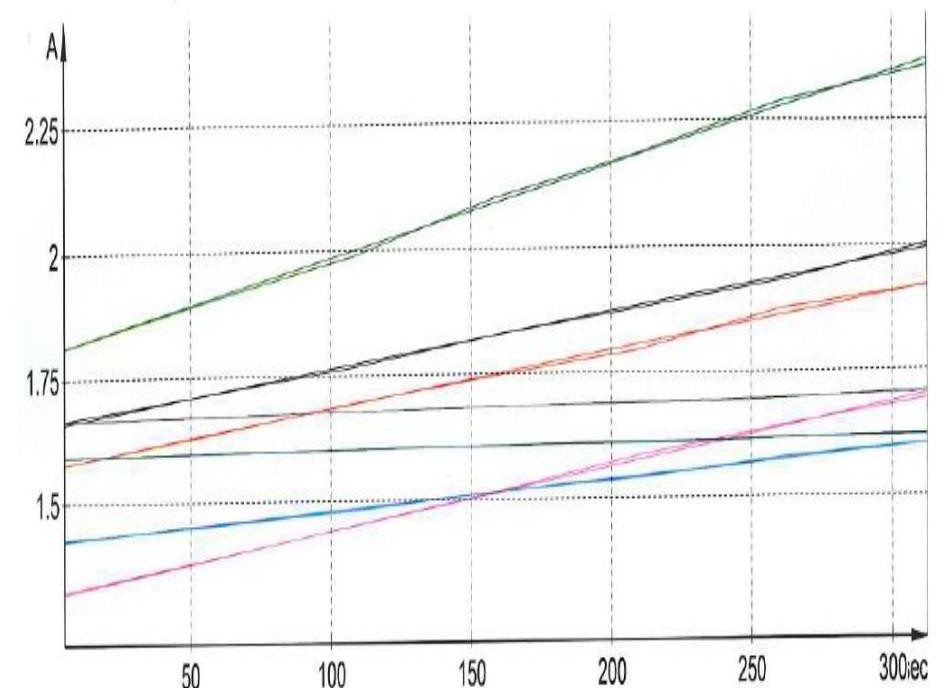
Lavages / Centrifugation

Résines de cellulose



Substrats en excès
T° et pH fixes

$$\Delta A = \varepsilon / c$$

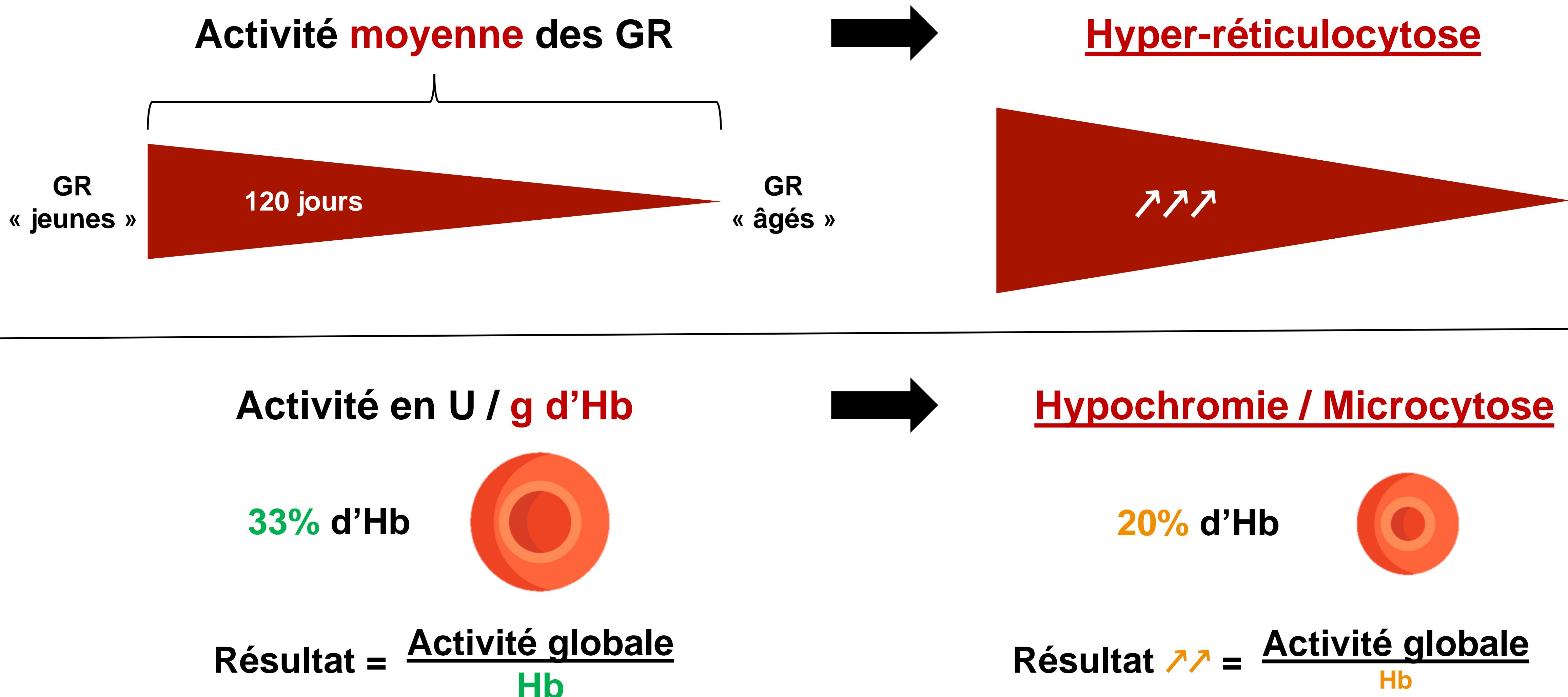


Activité en U / g d'Hb

Mesure de l'Hb dans le culot de GR



Interprétation des activités enzymatiques



Interprétation des activités enzymatiques

Exemple

G6PD = 10 U / g Hb [9 – 15] N
PK = 22 U / g Hb [9 – 17] ↑

Ratio < 0,5
Possible déficit

Réticulocytes ↑ = 180 G/L

Sexe masculin XY : Absence de déficit

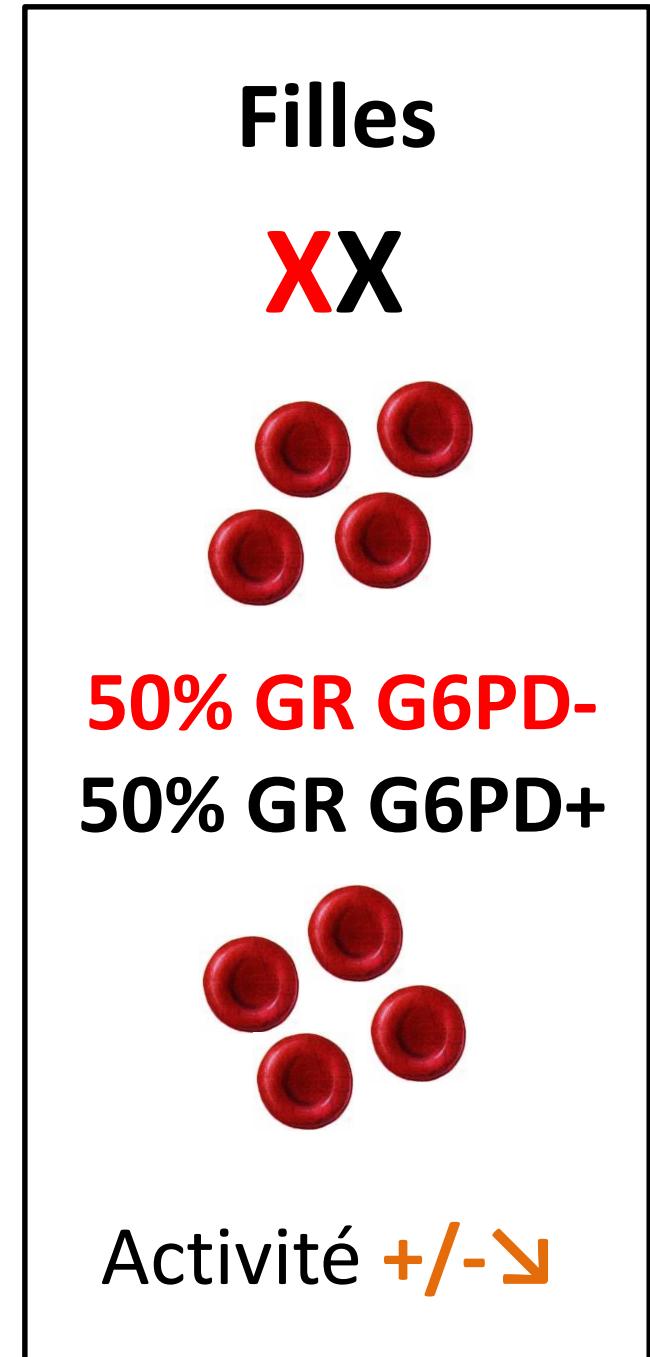
Sexe féminin XX

Normalisation via des ratios

Permet de s'affranchir des interférences du métabolisme du GR

Réticulocytes, CCMH

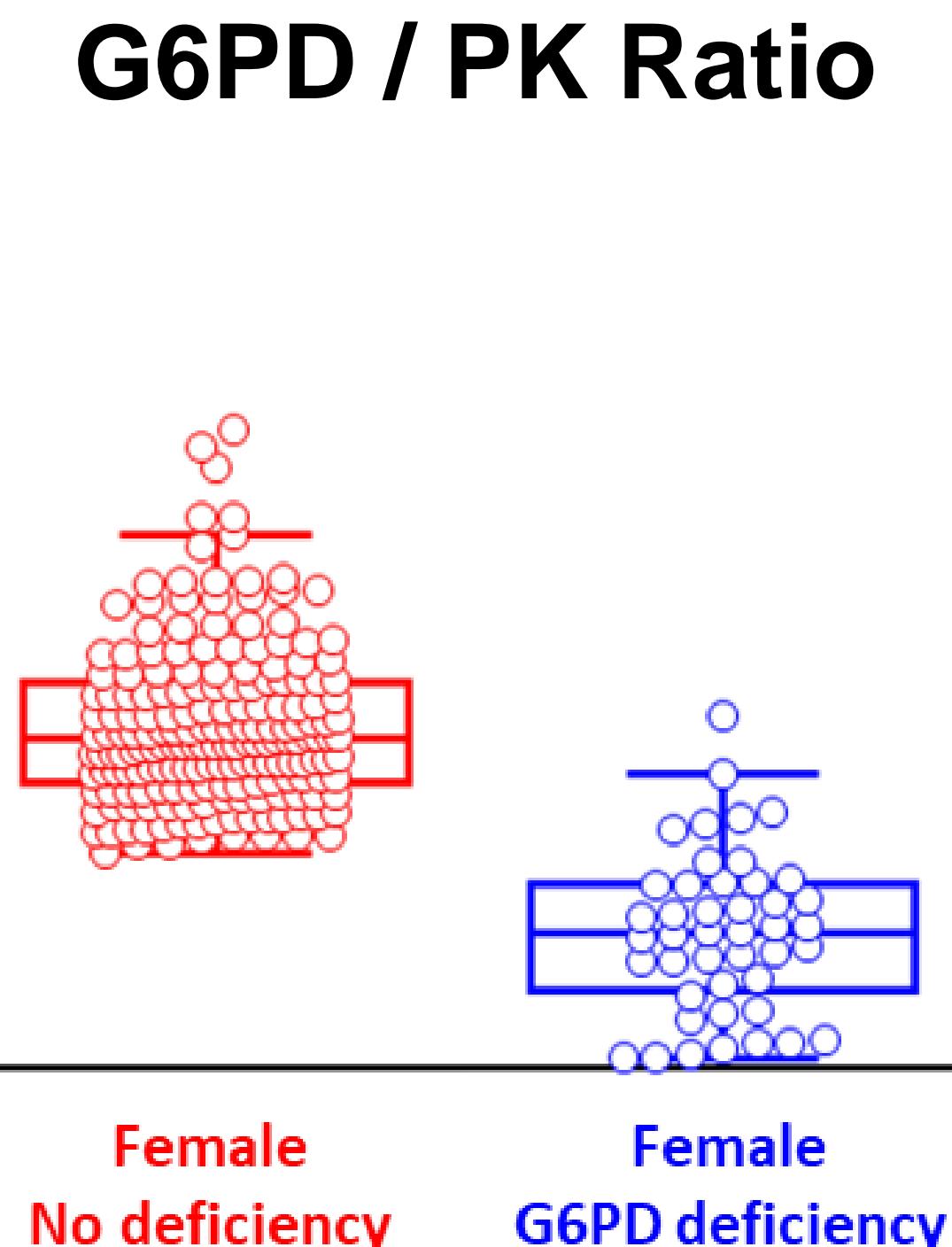
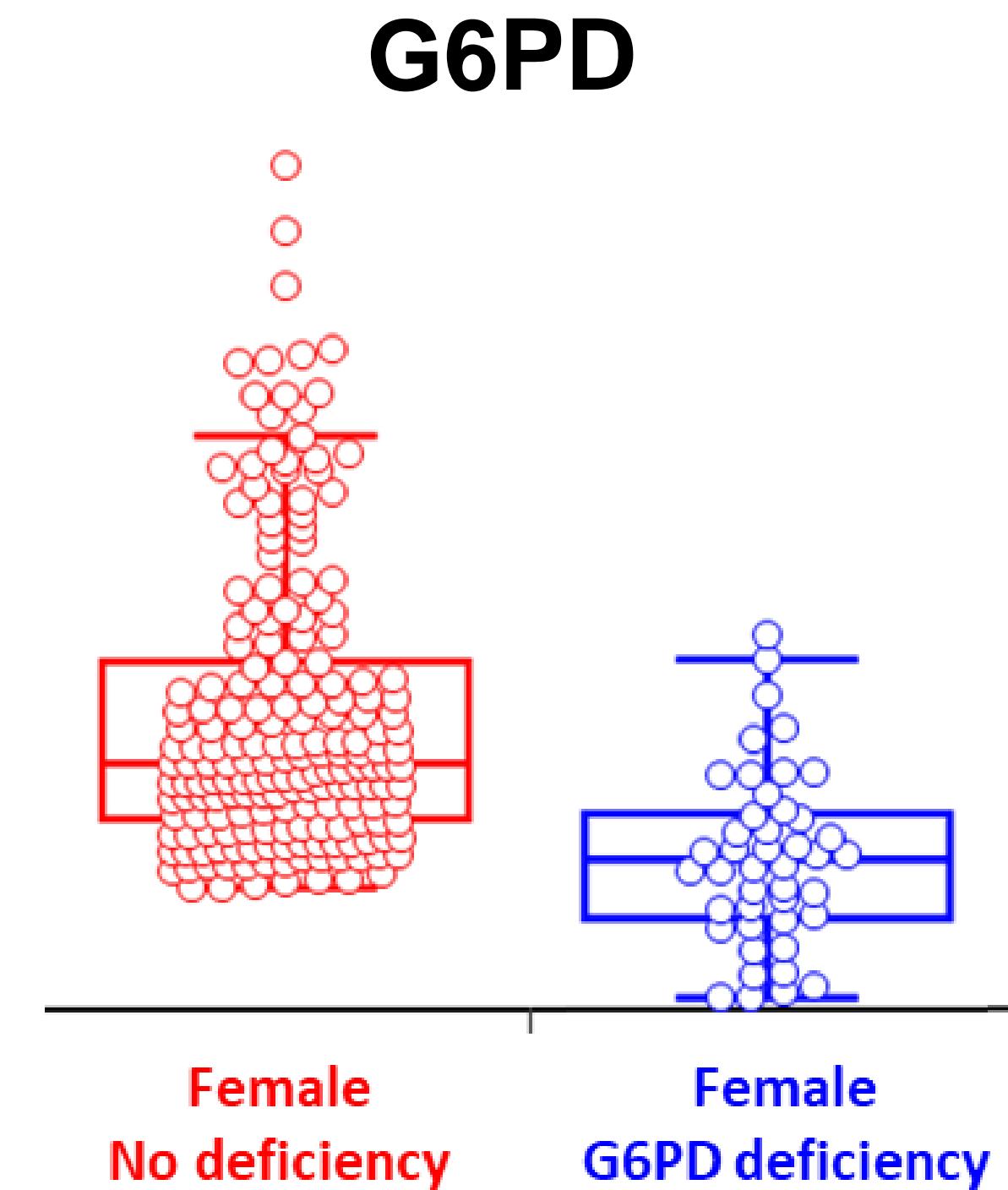
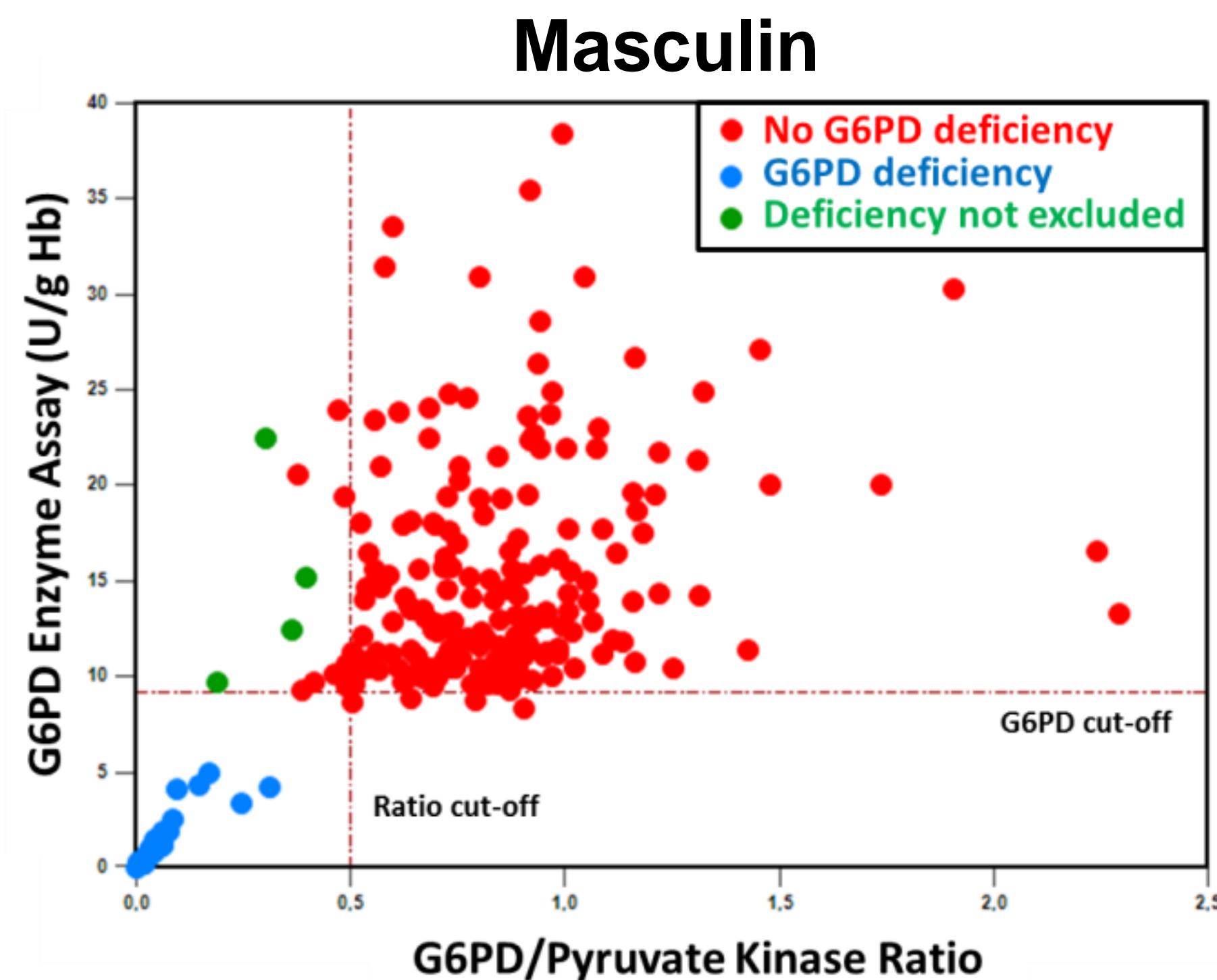
Conservation / Délai



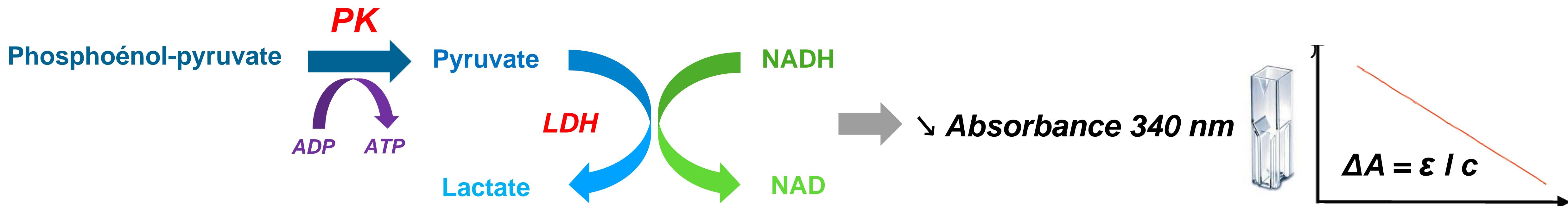
Interprétation des activités enzymatiques

Comparaison à une autre enzyme

- Pyruvate Kinase
- Hexokinase / 6PGD
- ASAT / LDH érythrocytaire



Mesure et interprétation de l'activité PK



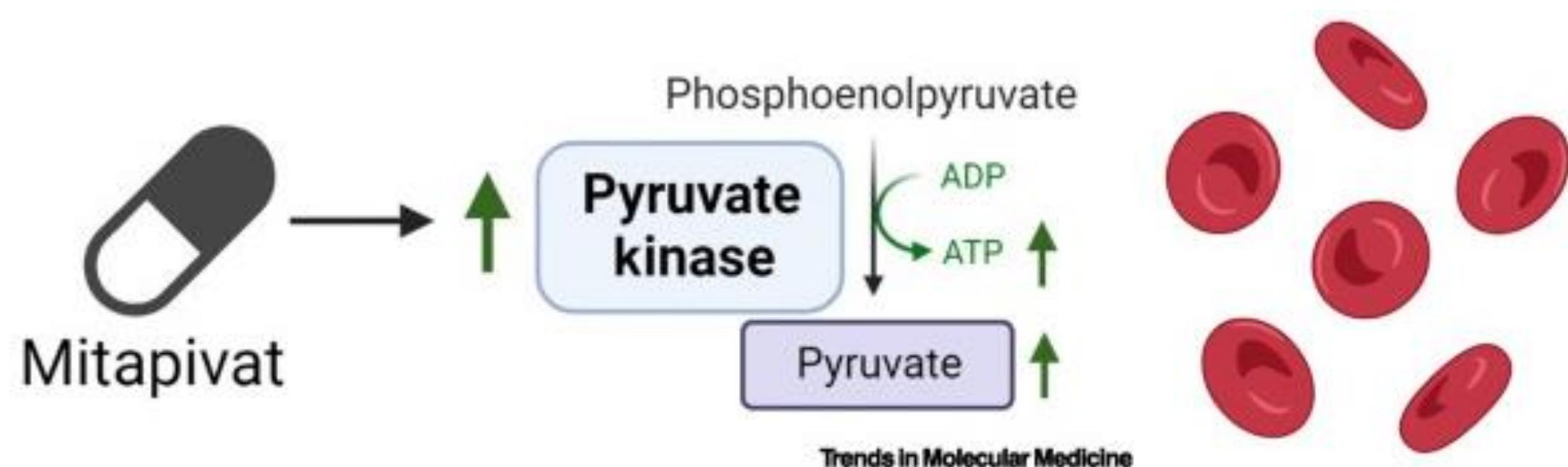
Transmission récessive

- Activité très diminuée => **Déficit en PK**
- Activité limite => **A contrôler** + Confronter bilan clinico-biologique **Hémolyse chronique?**
Détection possible d'hétérozygotes

Confirmation systématique par Biologie Moléculaire

- Pas de corrélation entre l'activité PK et la sévérité
- Activateurs allostériques de la Pyruvate Kinase

Au moins 1 mutation faux-sens



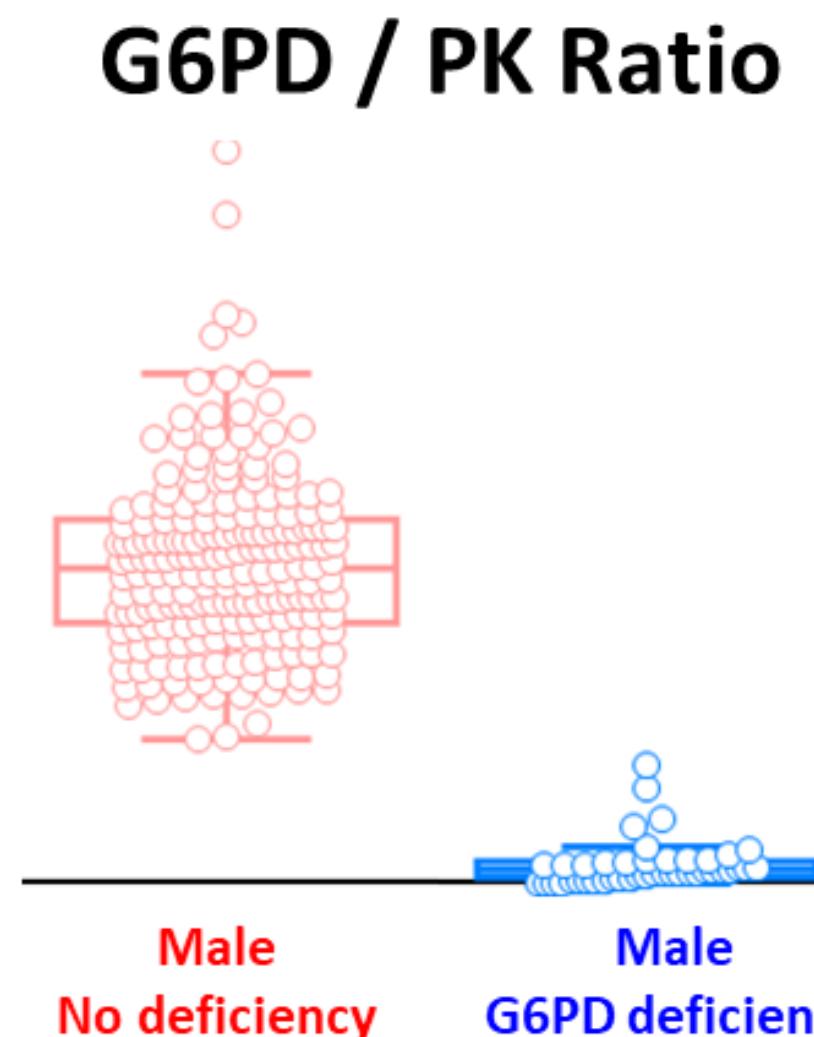
Conclusion sur les activités enzymatiques

Méthode de référence

Garçons : Diagnostic très performant pour les **G6PD- hémizygotes**

Filles: Sensibilité estimée à **80%** pour le diagnostic des **G6PD- hétérozygotes**

- => Déficit **probable**, à contrôler sur un second prélèvement
- => **Possible** déficit, à contrôler sur un second prélèvement
- => Résultats limites **ne permettant pas d'exclure un déficit**, à contrôler
- => **Absence de déficit apparent**



Impact d'une transfusion

Activité très basse ou très haute => **Interprétable**

Activité normale basse / limite => **A contrôler**

Transfusions multiples => **Ininterprétable**

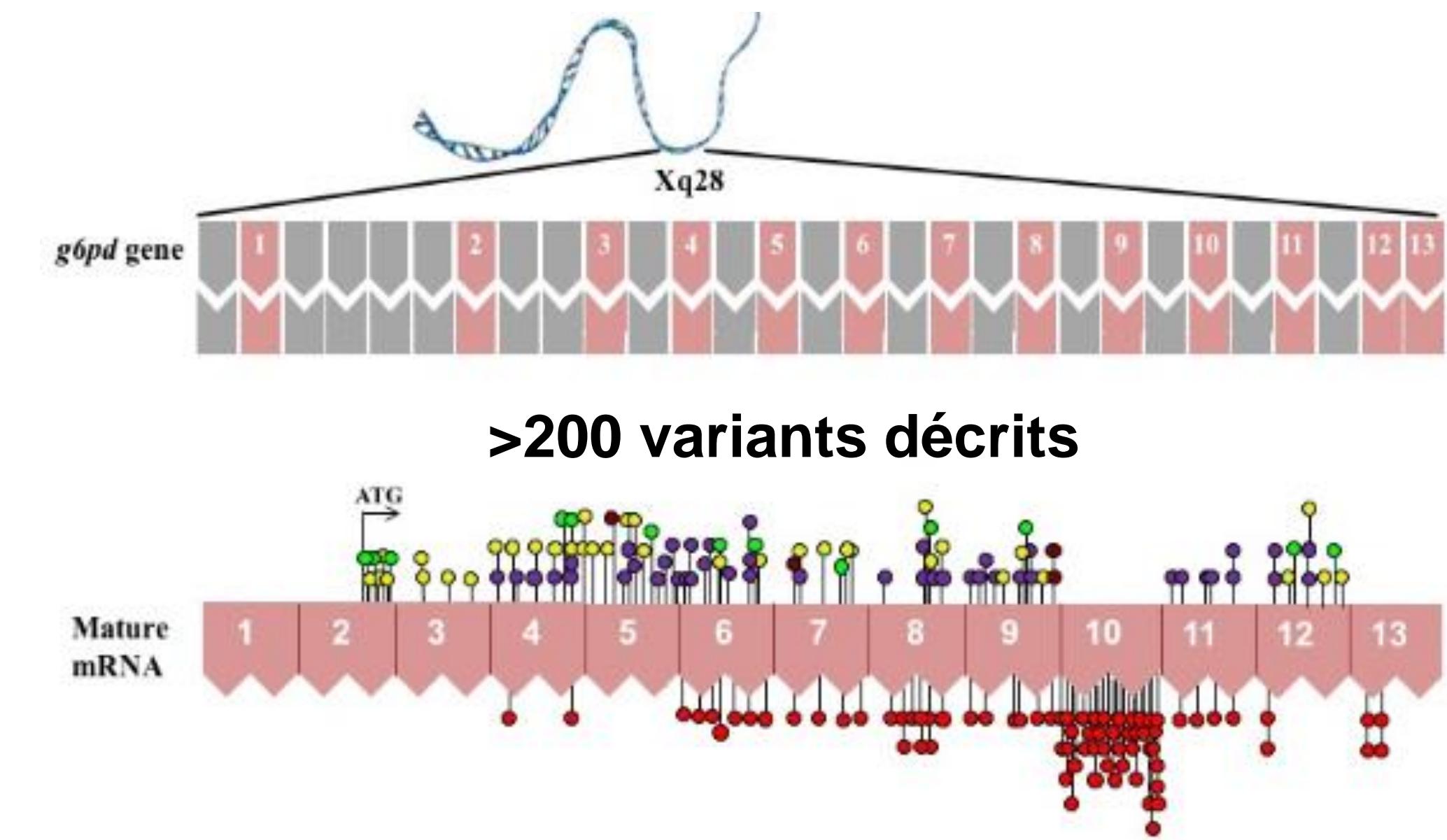
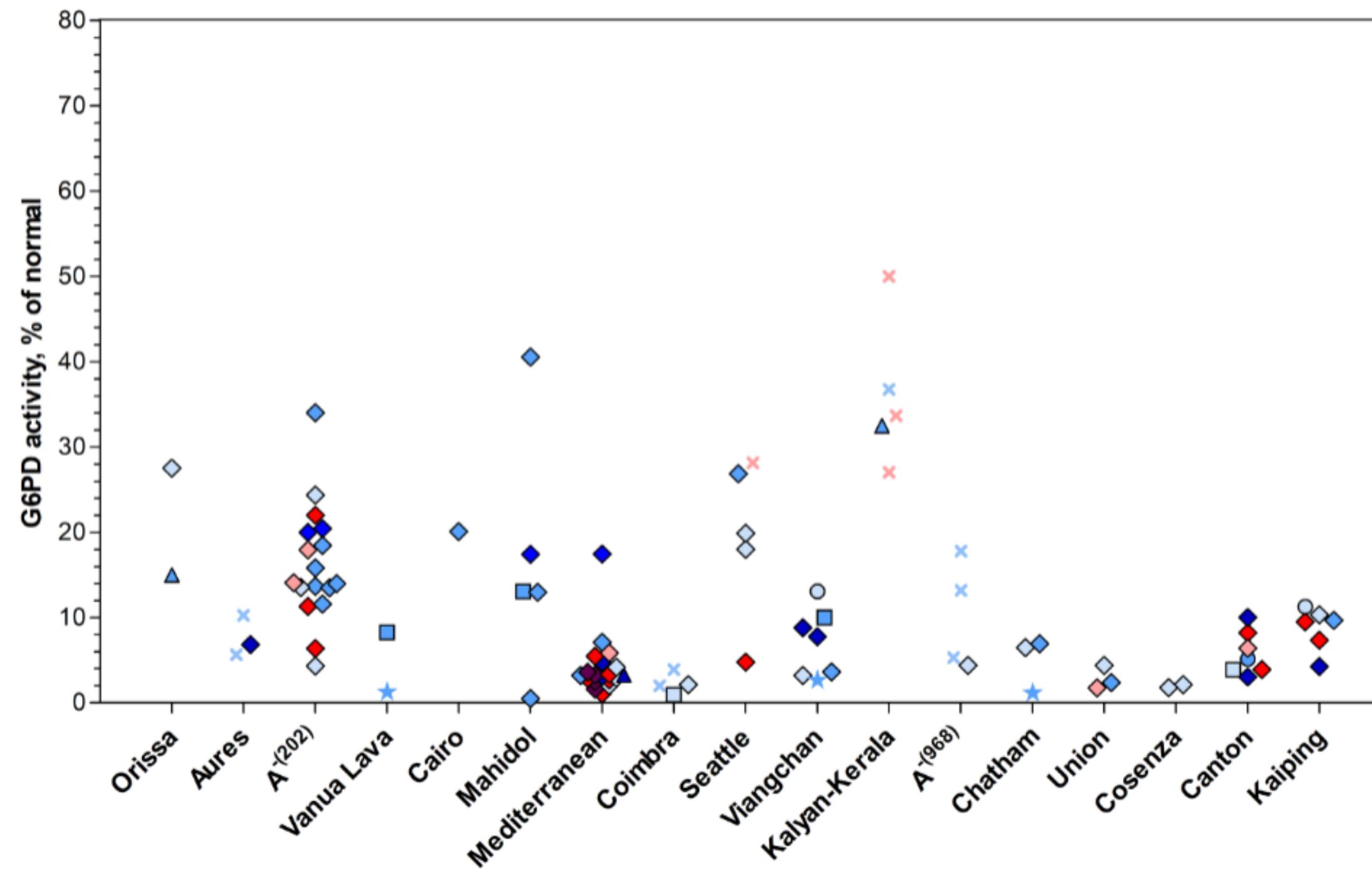
GR
« jeunes »

120 jours

CGR

GR
« âgés »

Alternatives



Classe de variant	Activité G6PD (% Médiane)	Manifestations cliniques
A	<20%	Anémie Hémolytique Chronique
B	<45%	Ictère néonatal / Anémie aigue provoquée
C	>60%	Pas d'hémolyse
U	-	Signification incertaine

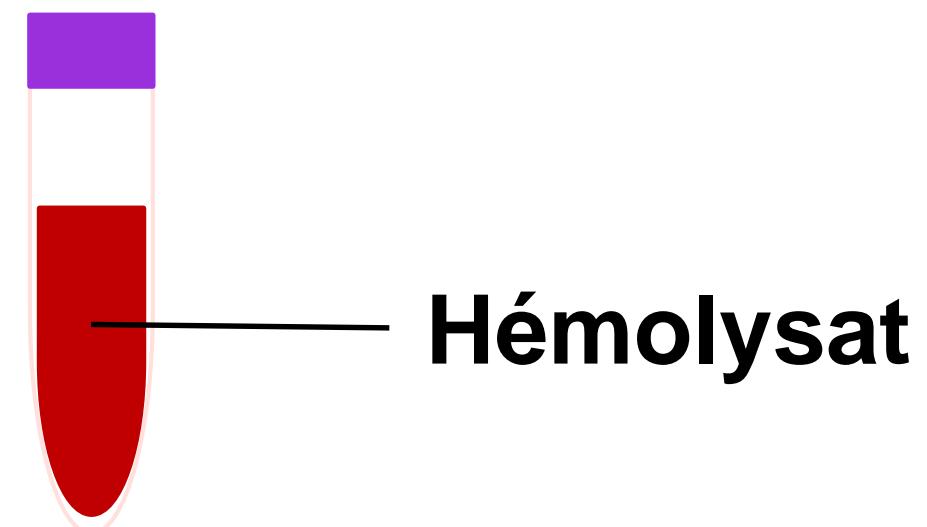


World Health Organization

G6PD par Cytométrie en Flux

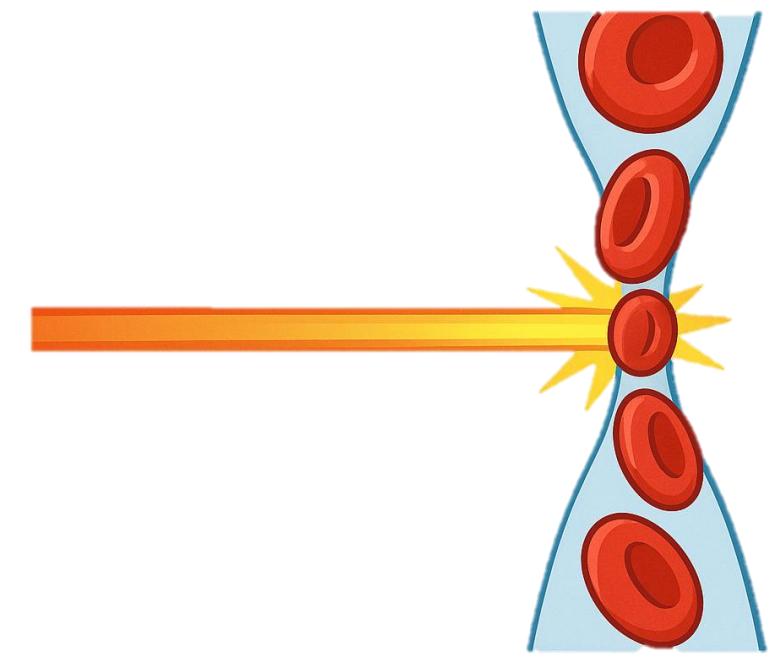
Activité enzymatique

Mesure globale

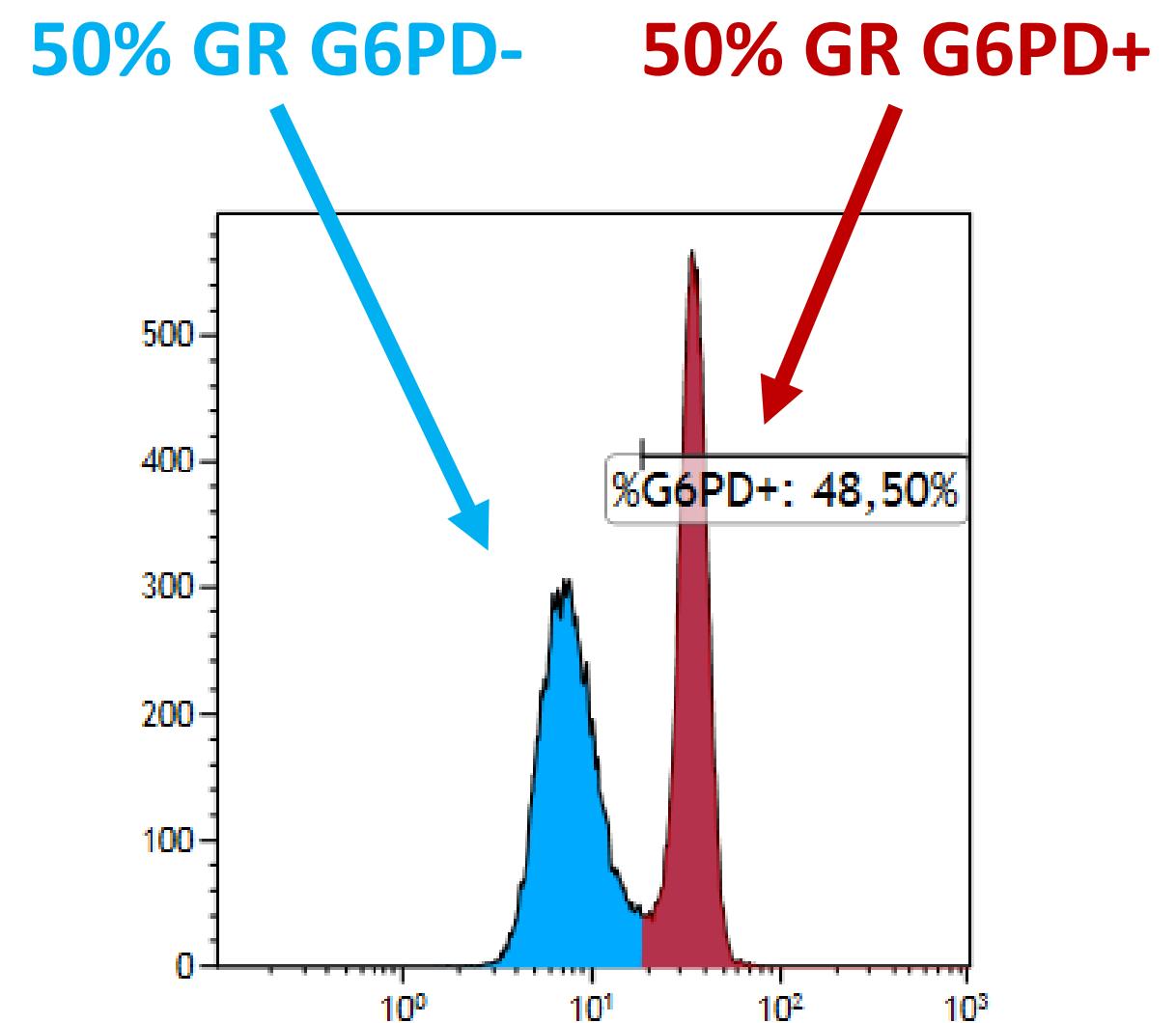
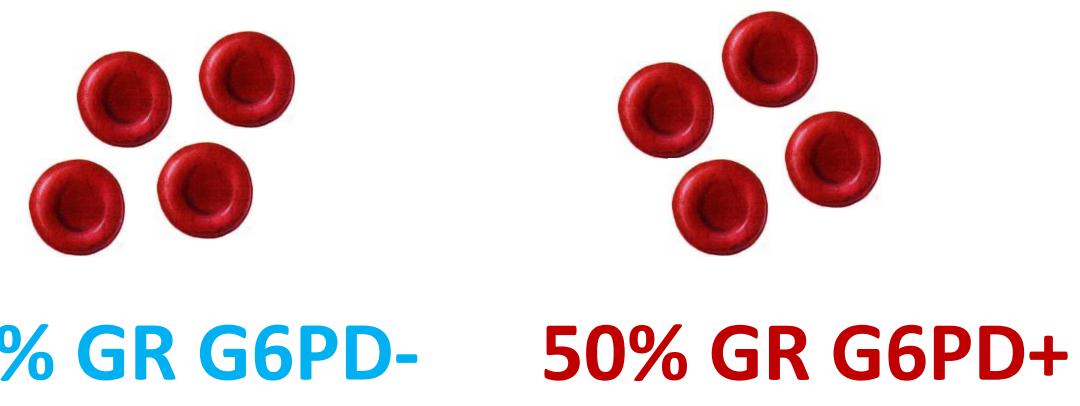


Cytométrie en flux

Analyse unicellulaire des GR



Filles XX



G6PD par CMF - Principe

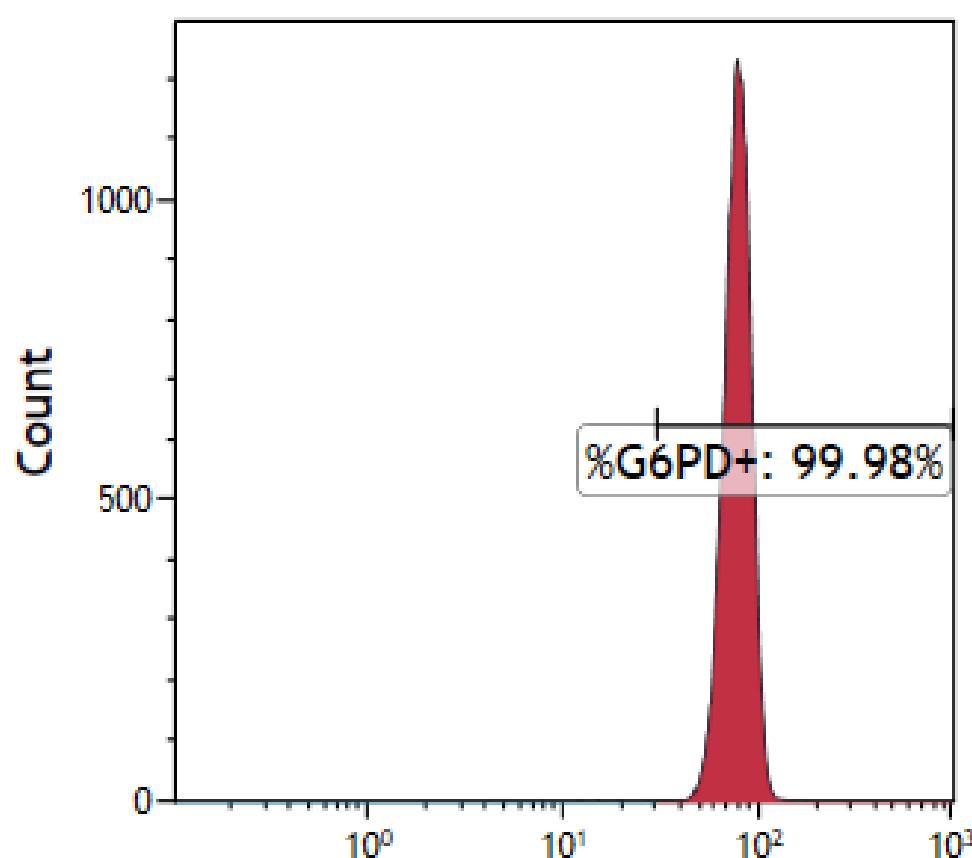
1) *Oxydation de l'Hémoglobine*



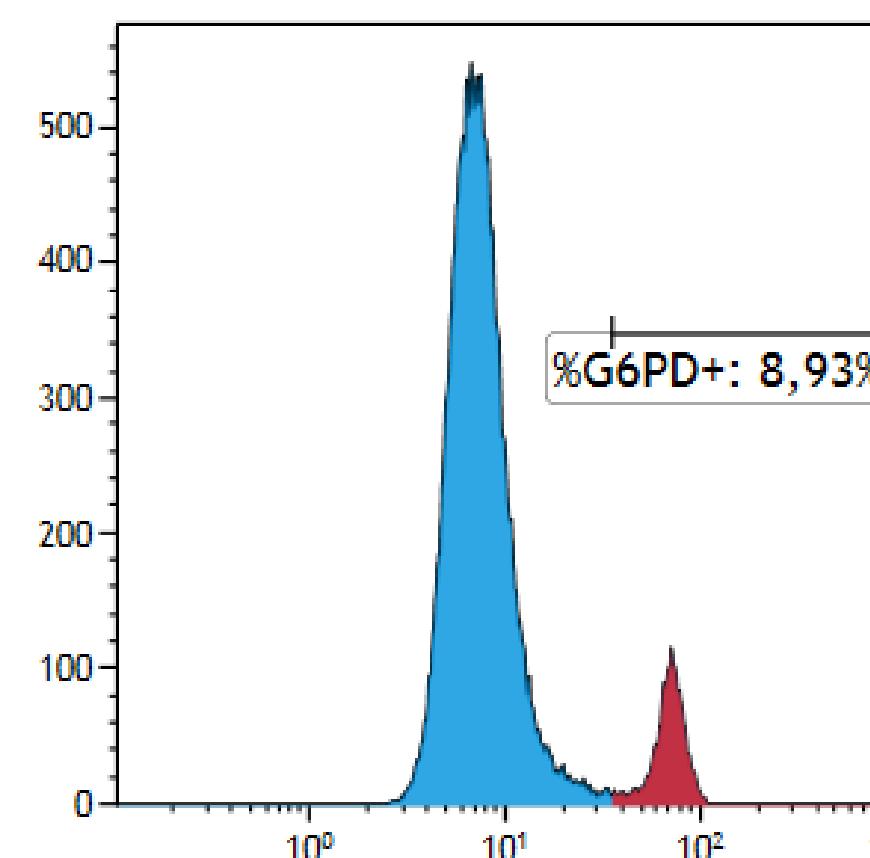
G6PD par CMF - Résultats

Statut G6PD

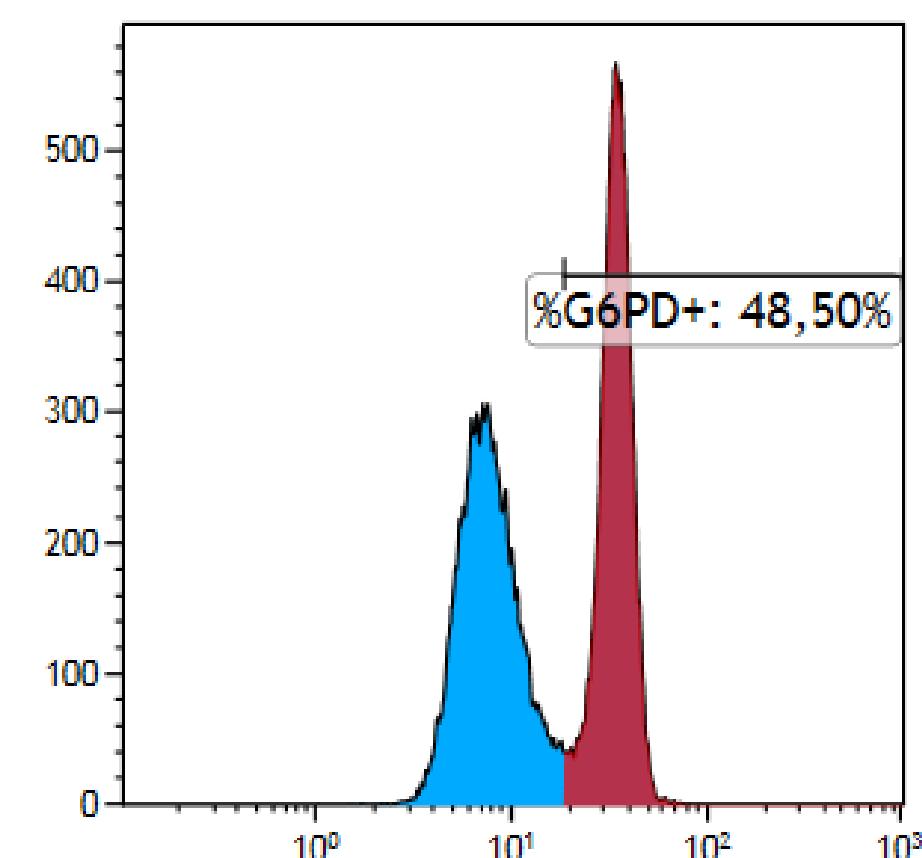
Normal



Hémizygote



Hétérozygote



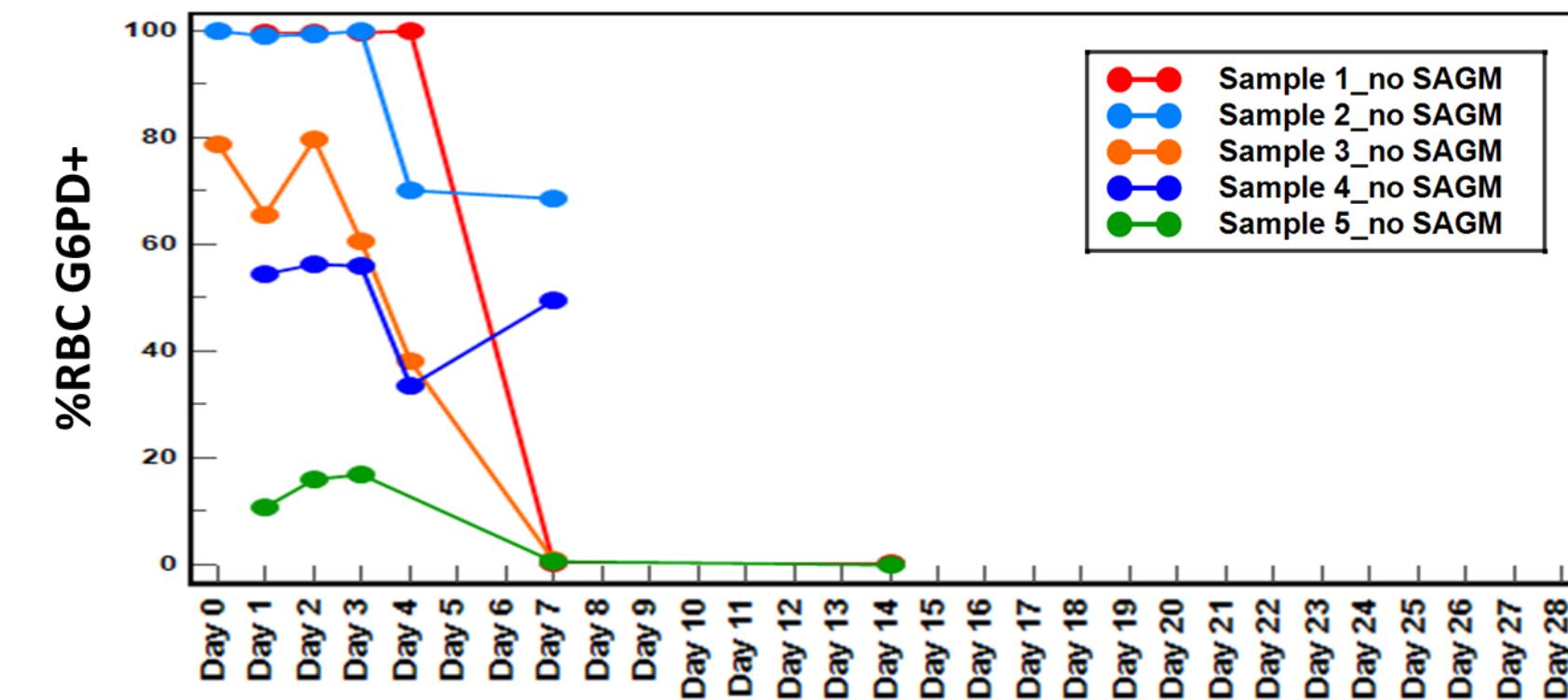
Echantillon : 100 µL de sang ACD / EDTA

Analyse de cellules vivantes

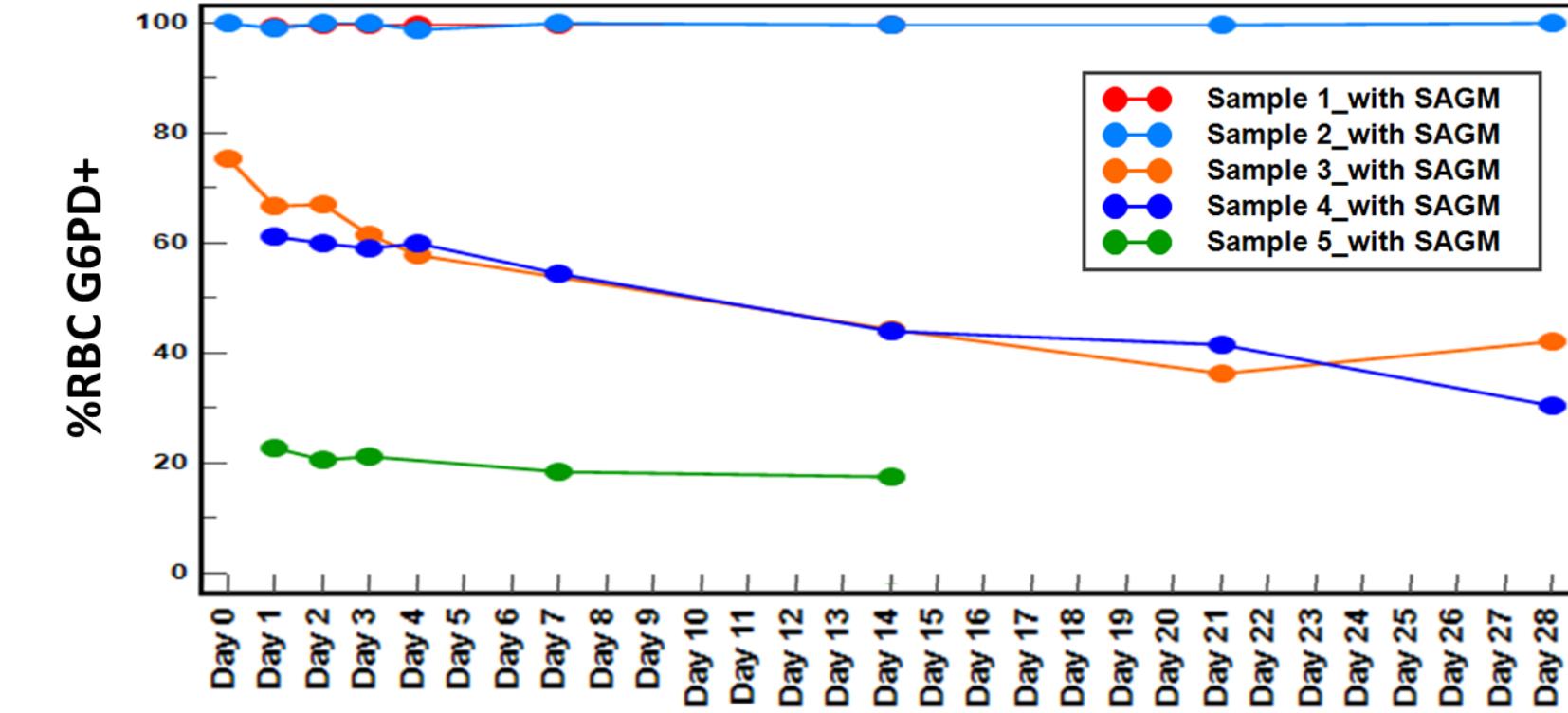
- Analyse à faire dans les 3 jours
- Jusqu'à J28 après ajout de SAGM



Sans SAGM



Avec SAGM

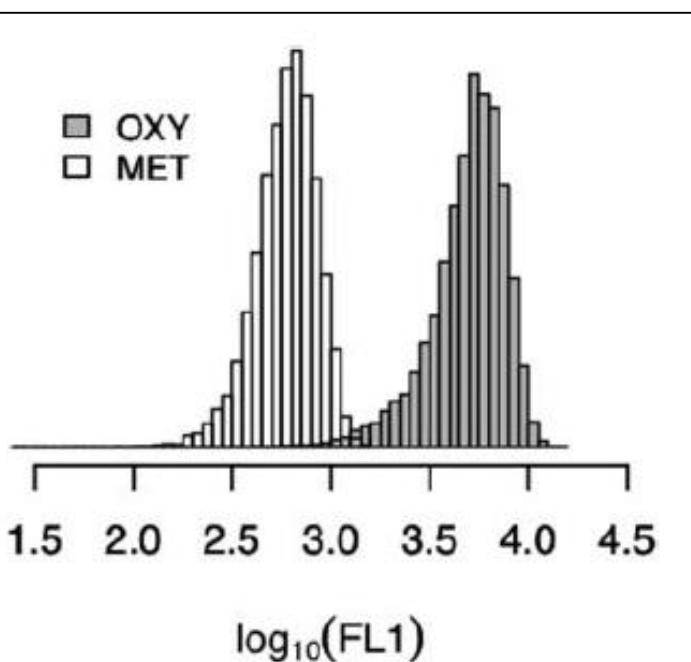


G6PD par CMF - Littérature

Shah et al. 2012 Scientific Reports

A novel cytofluorometric assay for the detection and quantification of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency

Shivang S. Shah^{1,2}, Seidina A. S. Diakite³, Karim Traore³, Mahamadou Diakite³, Dominic P. Kwiatkowski², Kirk A. Rockett², Thomas E. Wellem¹ & Rick M. Fairhurst¹

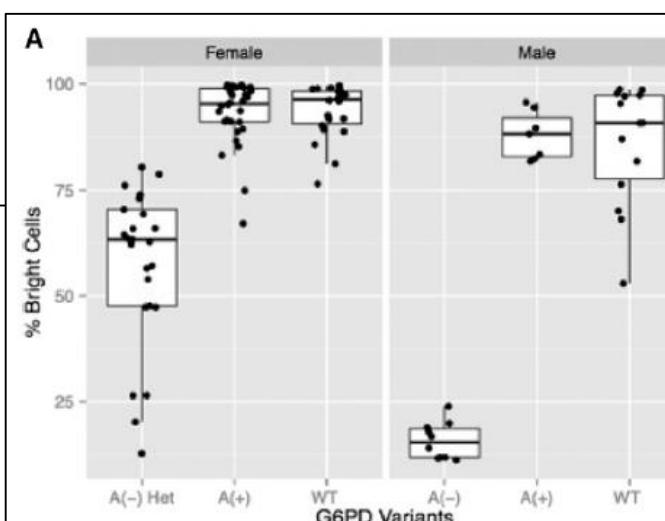


Larue et al. 2014 Journal of tropical medicine

Comparison of Quantitative and Qualitative Tests for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency

Nicole LaRue, Maria Kahn, Marjorie Murray, Brandon T. Leader, Pooja Bansil, Sarah McGay, Michael Kalnoky, Hao Zhang, Huiqiang Huang, Hui Jiang, and Gonzalo J. Domingo*

Diagnostics, PATH, Seattle, Washington; Tsuga Analytics, Seattle, Washington; Genomics, Beijing Genome Institute-Shenzhen, Shenzhen, China

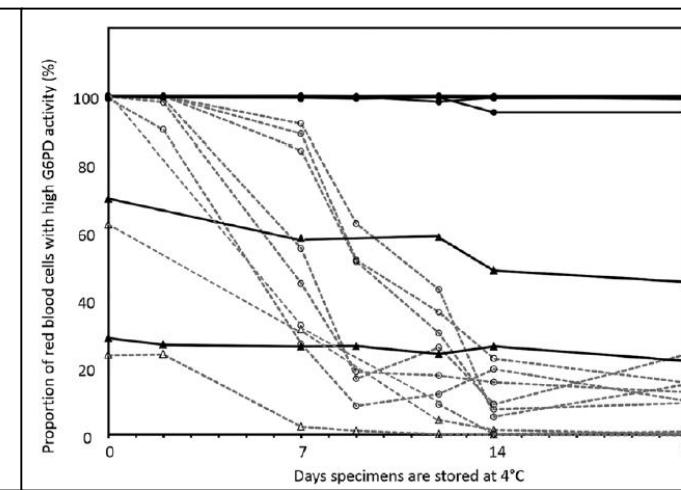


Kahn et al. 2015 Journal of Histochemistry & Cytochemistry

Maintaining Specimen Integrity for G6PD Screening by Cytofluorometric Assays

Maria Kahn, Walter H. J. Ward, Nicole LaRue, Michael Kalnoky, Sampa Pal, and Gonzalo J. Domingo

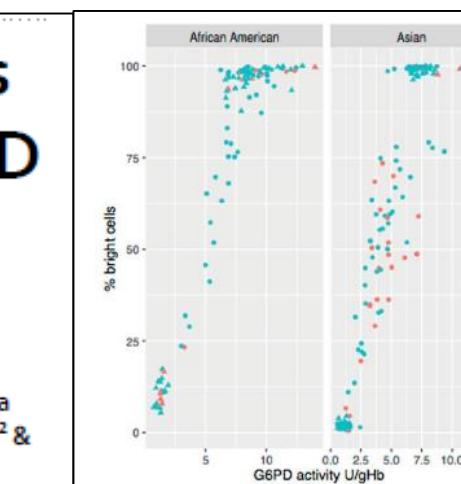
PATH, Seattle, Washington (MK, NL, MK, SP, GJD); and Walter Ward Consultancy & Training, New Mills High Peak, United Kingdom (WHJW)



Bancone et al. 2017 Scientific Reports

The G6PD flow-cytometric assay is a reliable tool for diagnosis of G6PD deficiency in women and anaemic subjects

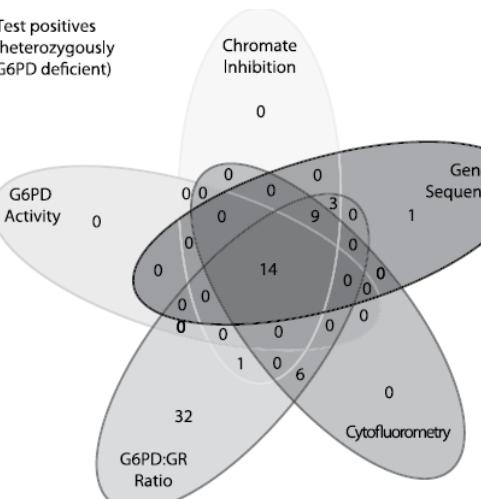
Germana Bancone^{1,5}, Michael Kalnoky², Cindy S. Chu^{1,5}, Nongnud Chowwiwat¹, Maria Kahn², Benoit Malleret^{3,4}, Pornpimon Wilairisak¹, Laurent Rénia³, Gonzalo J. Domingo² & Francois Nosten^{1,5}



Peters et al. 2017 Journal of Histochemistry & Cytochemistry

Comparison of Spectrophotometry, Chromate Inhibition, and Cytofluorometry Versus Gene Sequencing for Detection of Heterozygously Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-Deficient Females

Anna L. Peters, Martijn Veldthuis, Karin van Leeuwen, Patrick M.M. Bossuyt, Alexander P.J. Vlaar, Robin van Bruggen, Dirk de Korte¹, Cornelis J.F. Van Noorden,* and Rob van Zwieten



Kapadia et al. 2021 Tropical Medicine and International Health

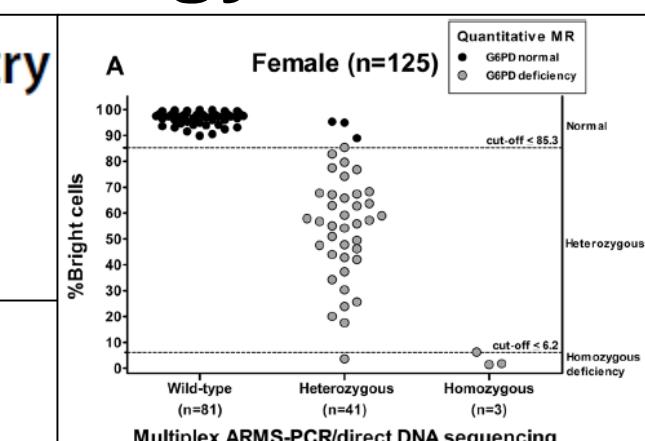
Evaluation of a flow cytometric test for G6PD-deficient erythrocytes

Alpeshkumar Bipinbhai Kapadia¹, Prashant Sharma¹, Karuna Jain¹, Man Updesh Singh Sachdeva¹, Parveen Lata Bose¹, Minakshi Gupta¹, Alka Rani Khadwal², Amanjit Bal³, Reena Das¹ and Neelam Varma¹

Thedsawas et al. 2022 Annals of Hematology

Cut-off values for diagnosis of G6PD deficiency by flow cytometry in Thai population

Anchalee Thedsawad¹ · Wanchai Wanachiwanawin¹ · Orathai Taka¹ · Chattree Hantaweeprant¹

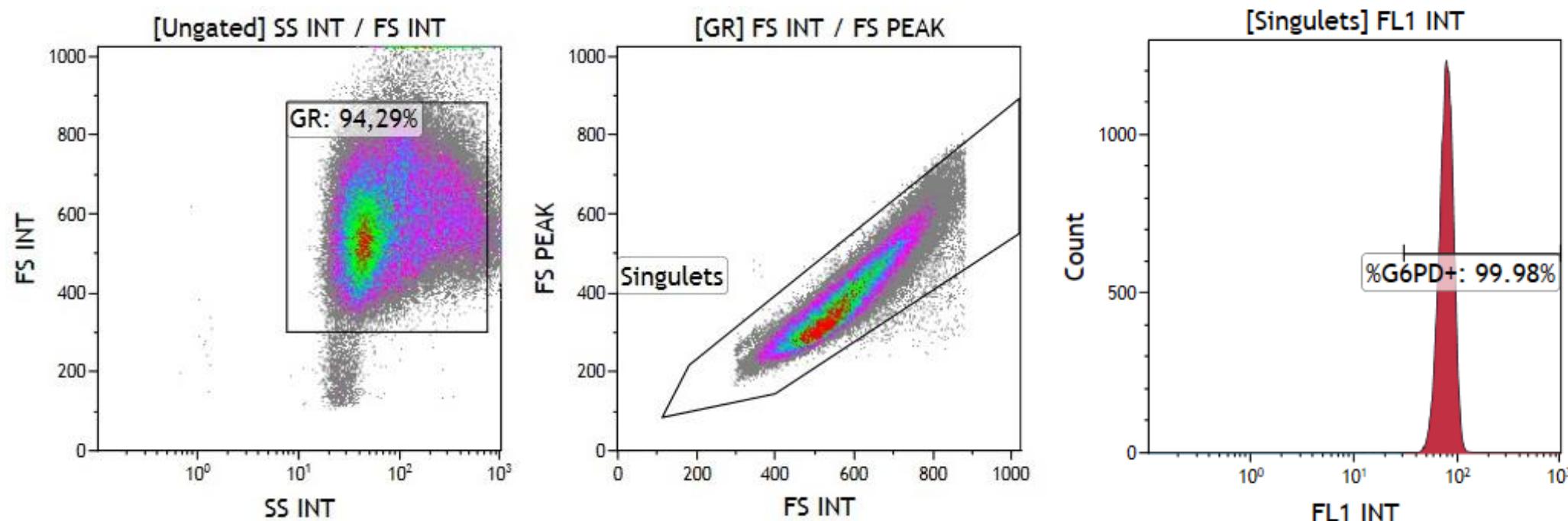


G6PD par CMF – Expérience rouennaise

514 patients entre octobre 2022 et décembre 2023

➤ **Spectro + CMF**

2 cytomètres Navios EX (Beckman-Coulter)

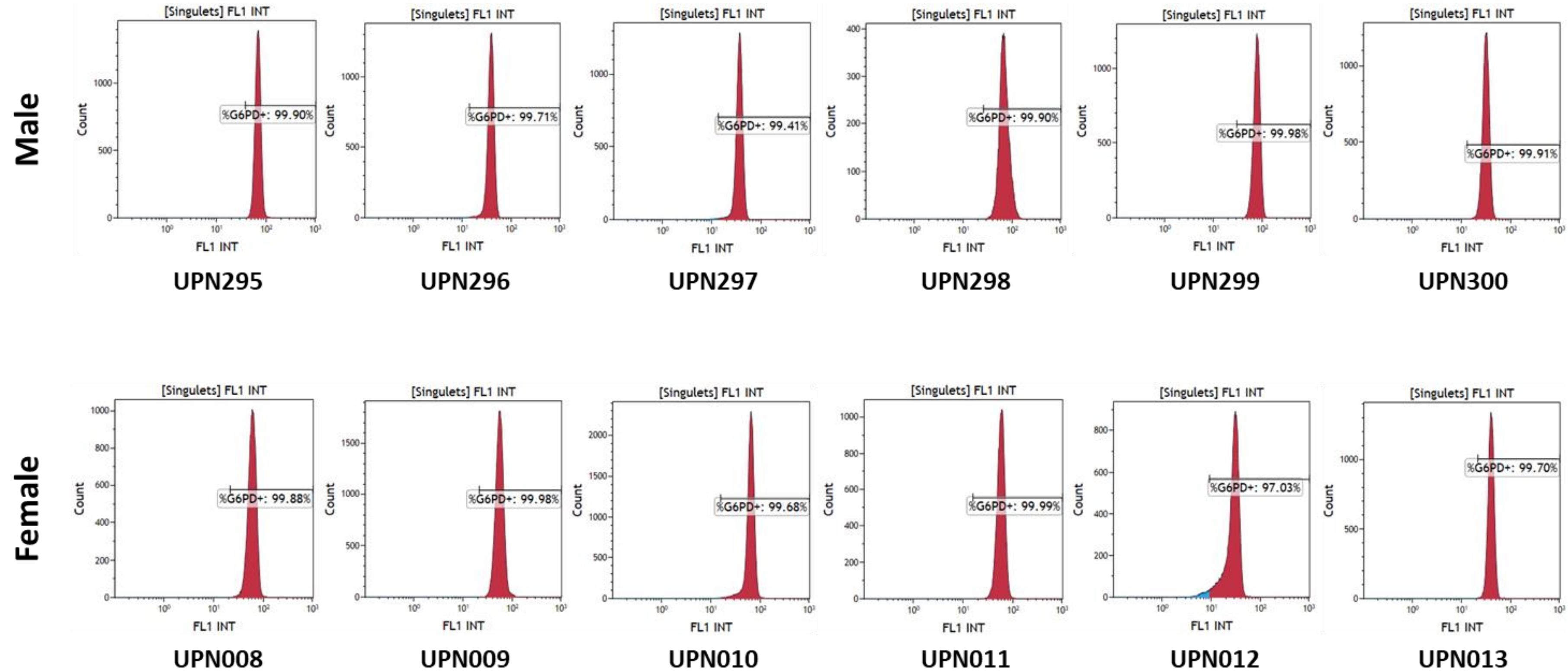


Analyse de **50 000 GR minimum**
Fluorescence recueillie en **FL1 (canal FITC)**

Passage au cytomètre **dans les 30 minutes** après technique

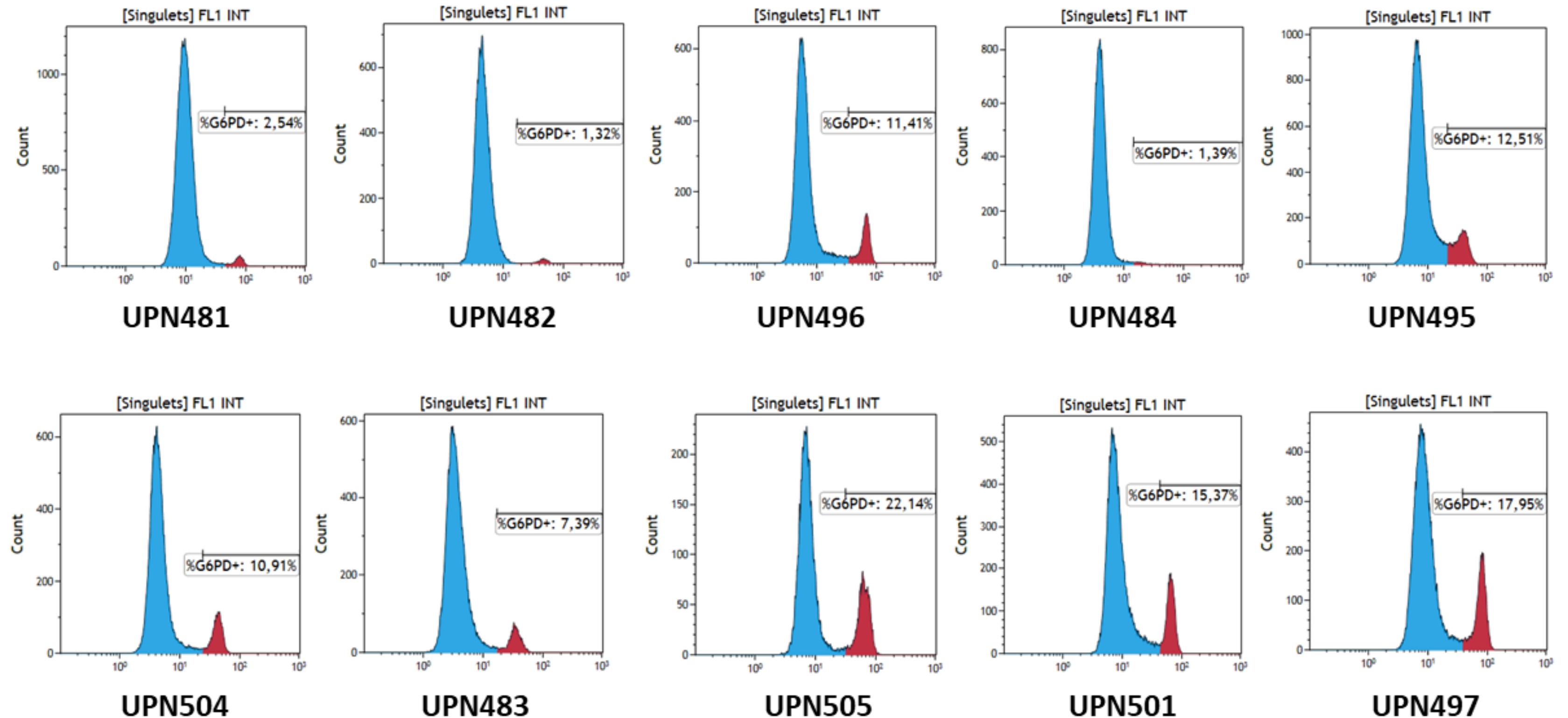
G6PD par CMF – Expérience rouennaise

- Résultats normaux



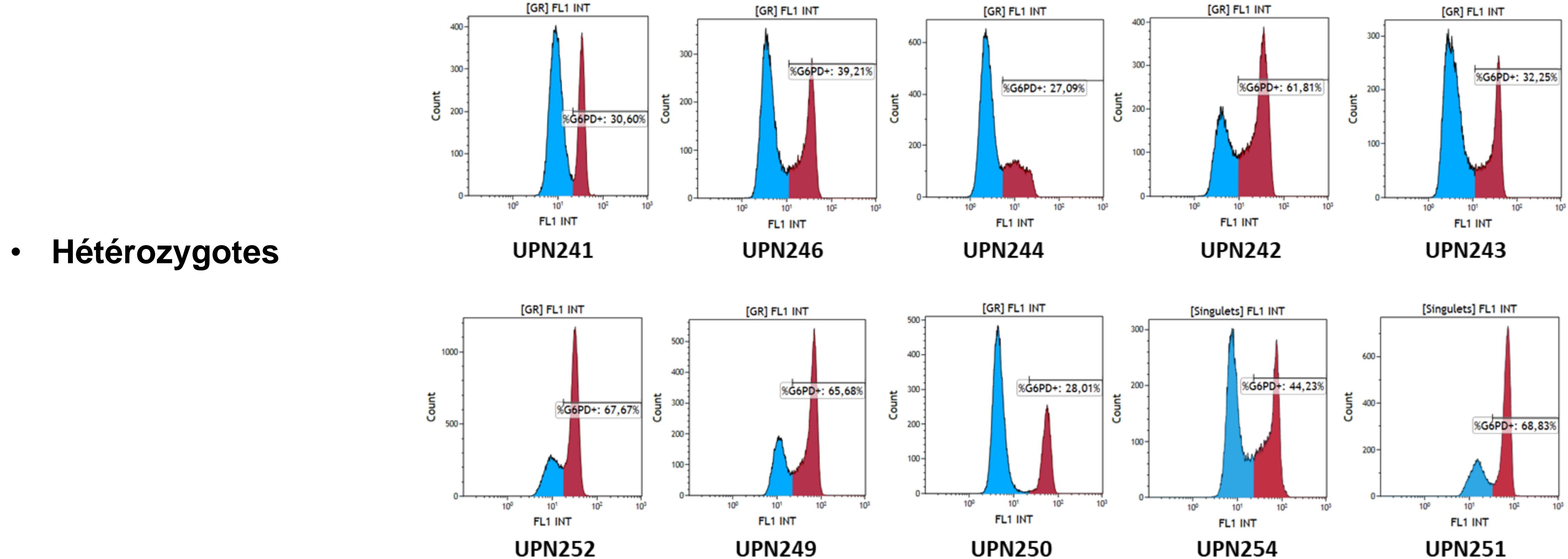
G6PD par CMF – Expérience rouennaise

- Hémizygotes



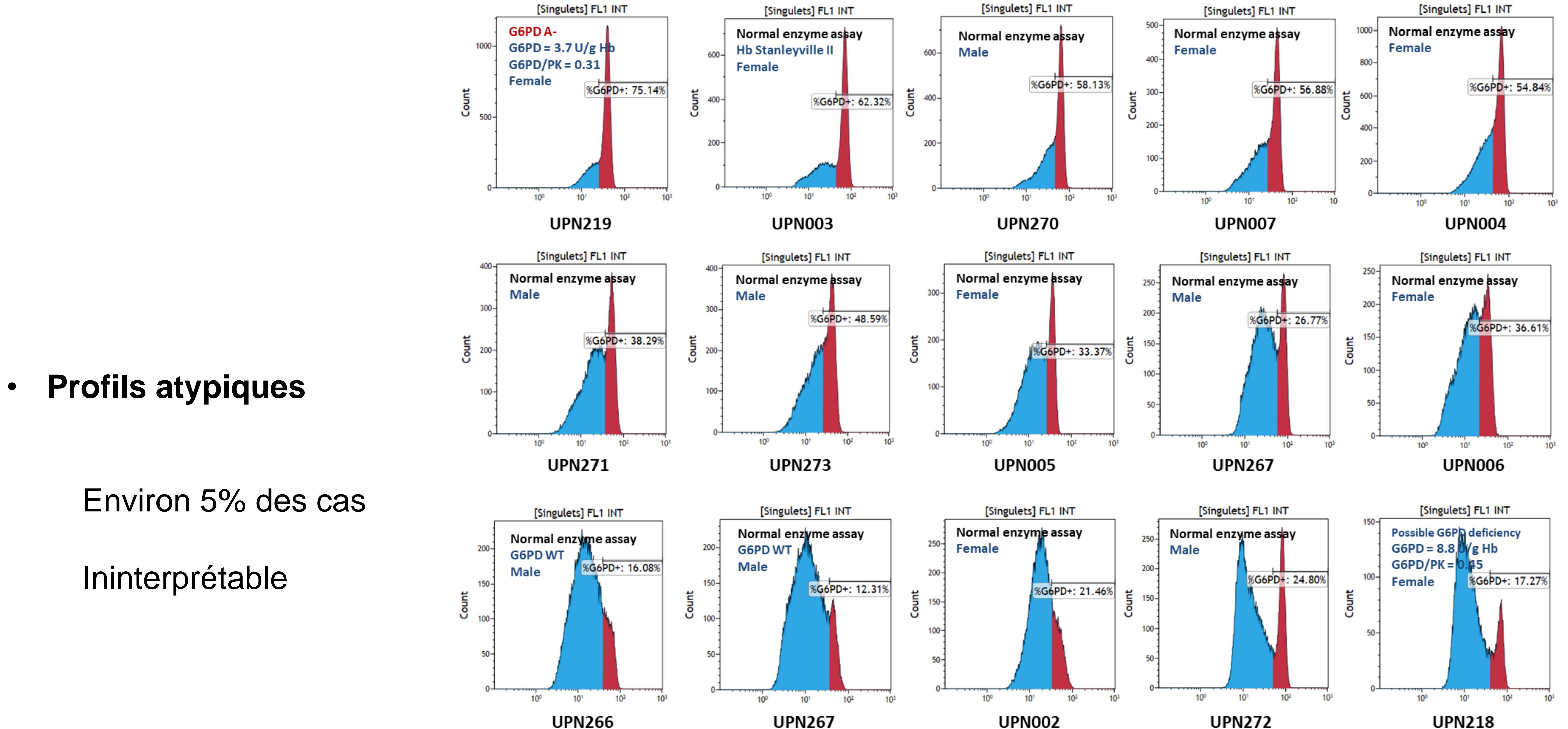
Contingent de 5-20% de GR G6PD+

G6PD par CMF – Expérience rouennaise



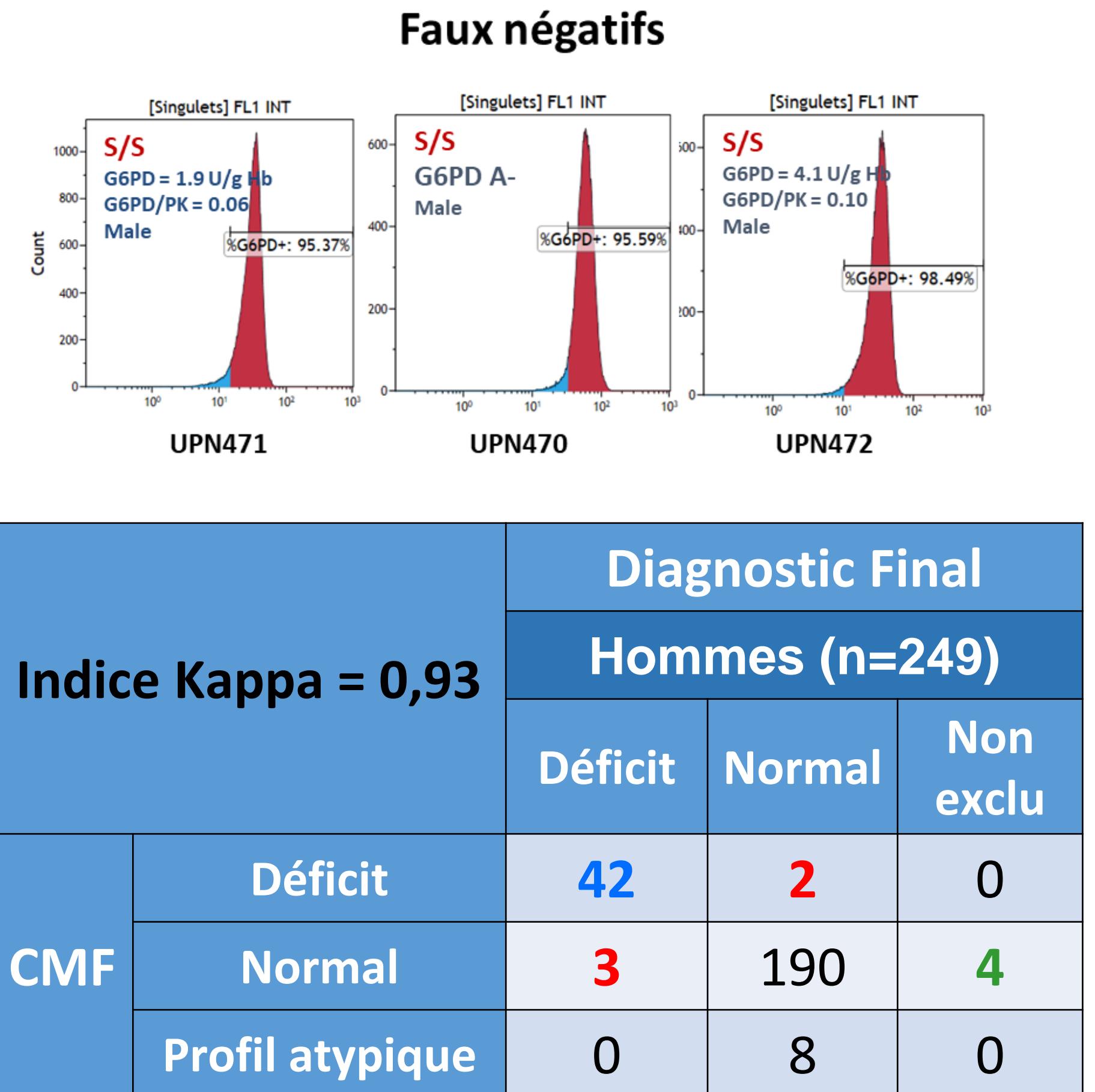
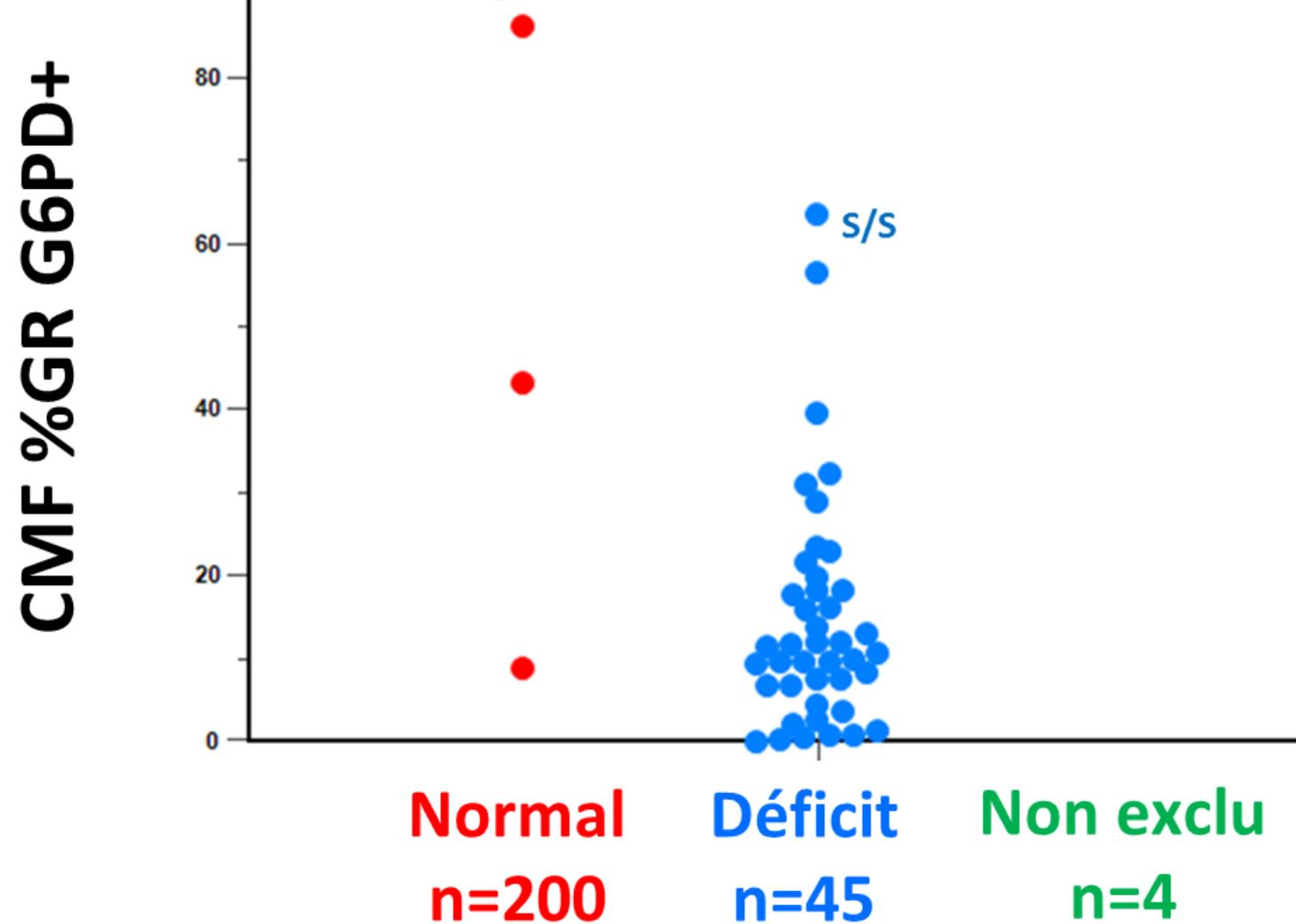
Environ 50% de **GR G6PD+**
Variable : Inactivation préférentielle d'un X

G6PD par CMF – Expérience rouennaise



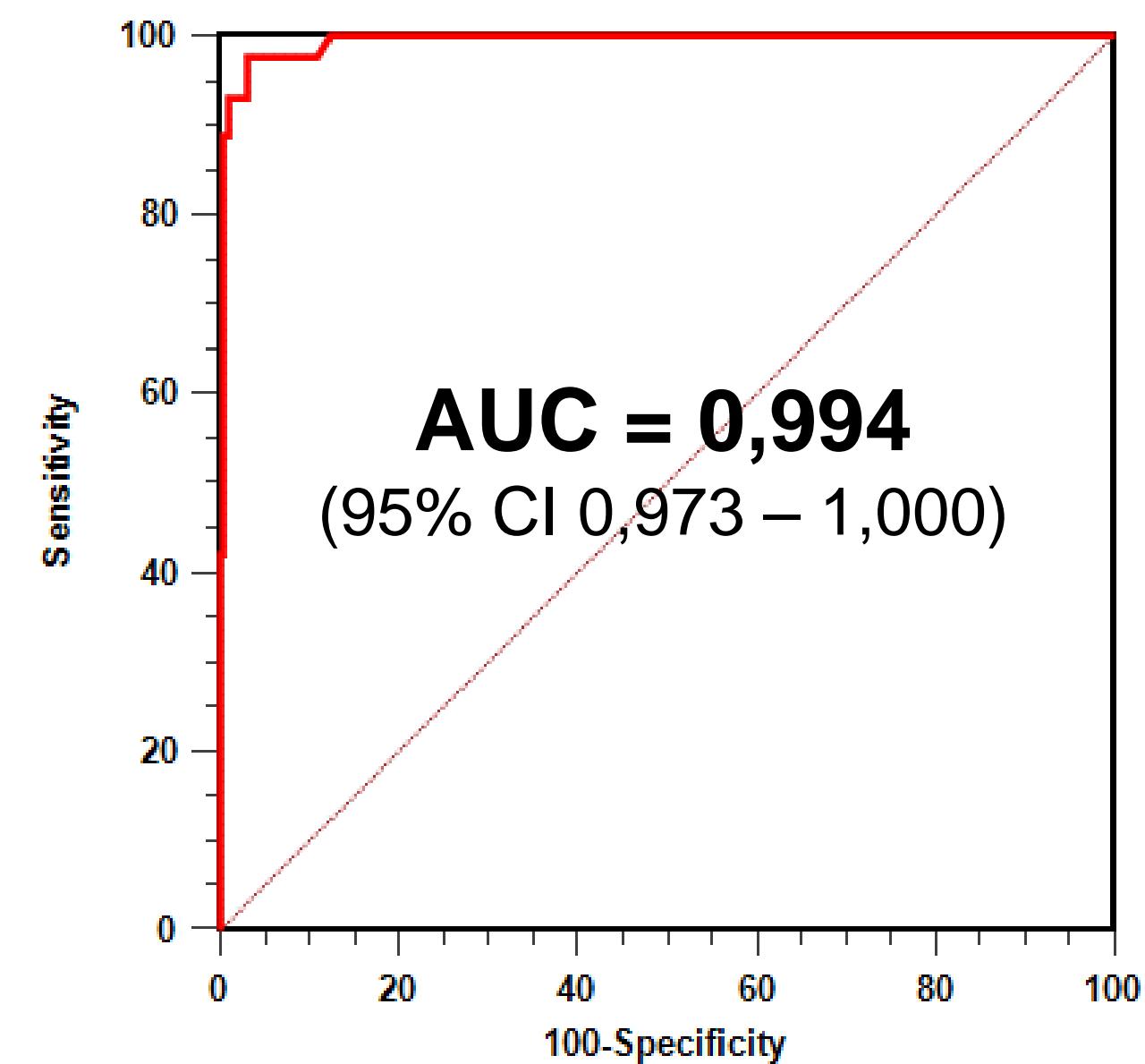
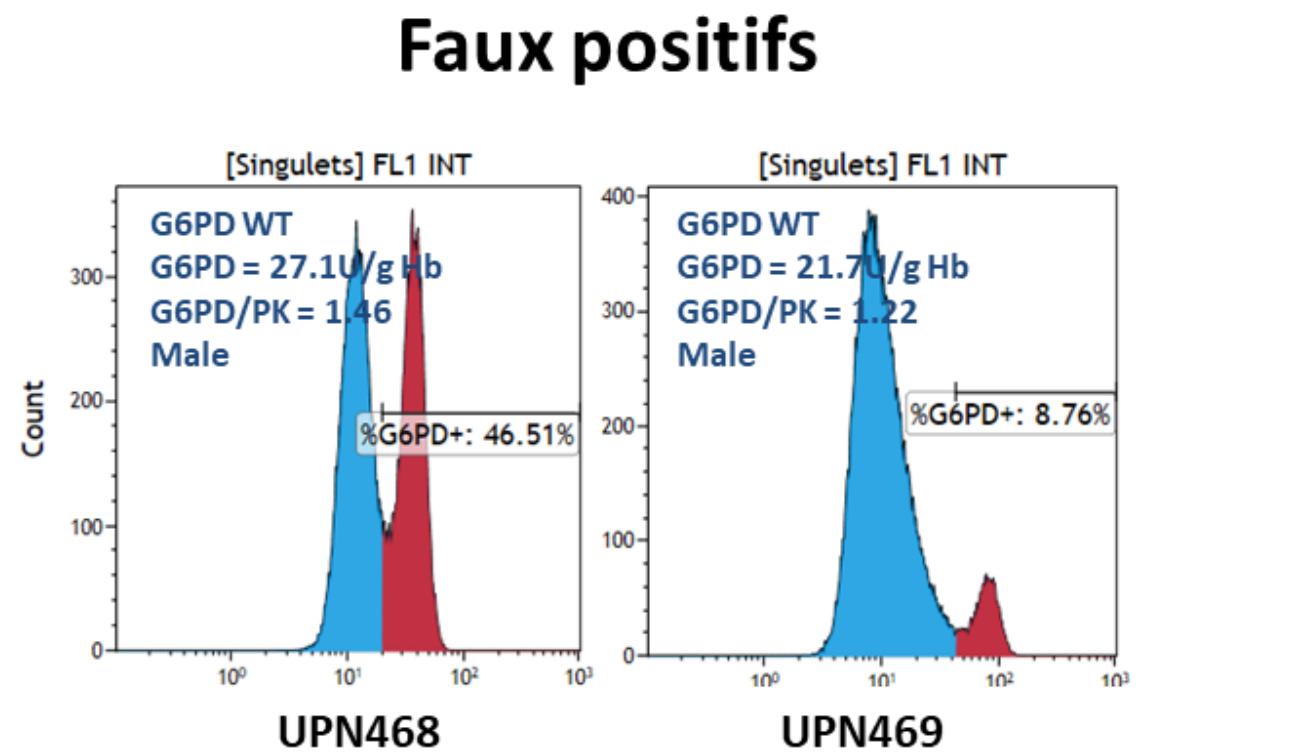
Performances du test par CMF

Hommes



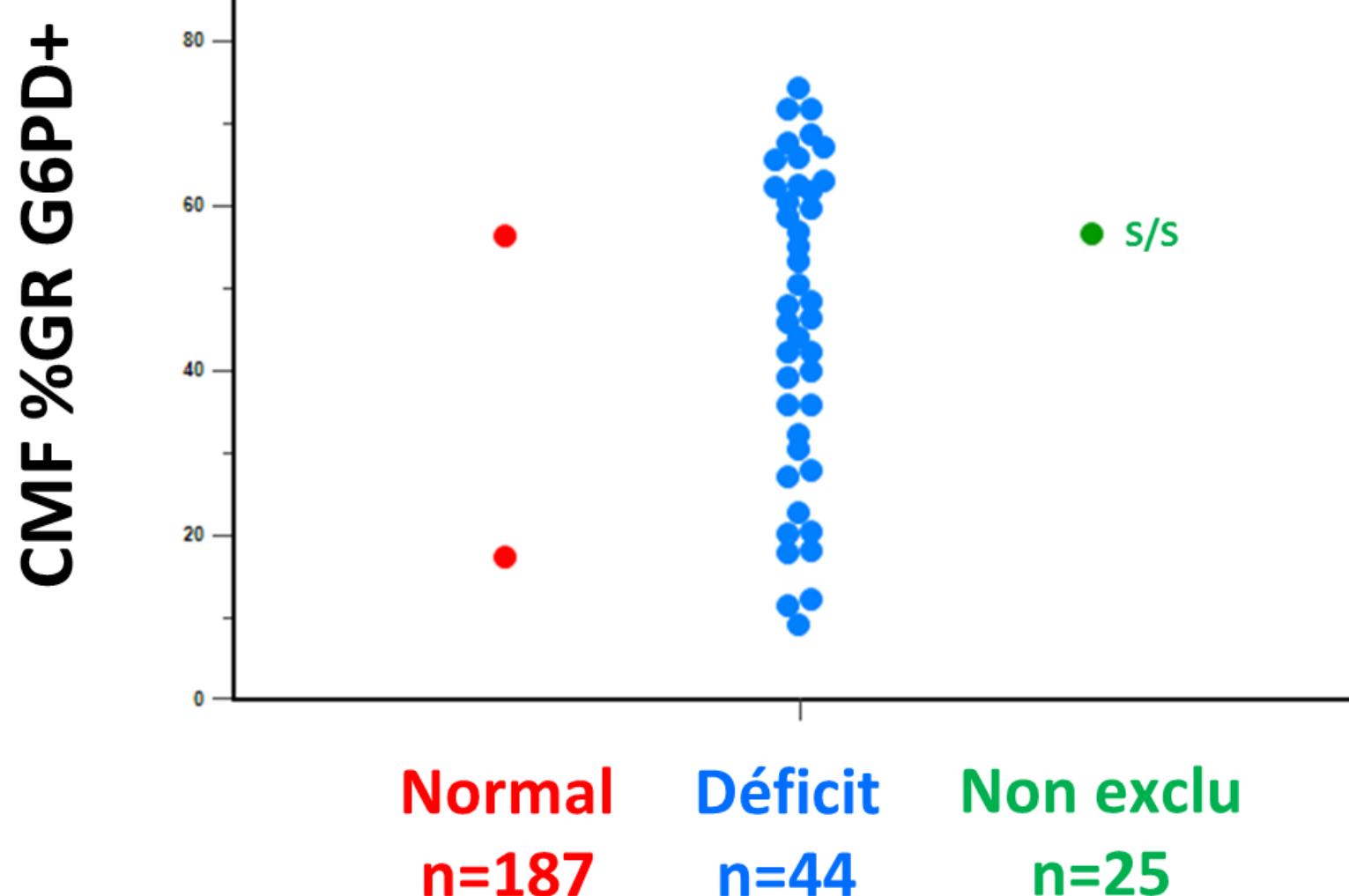
Se = 93,3%
Sp = 99,0%

VPP = 95,5%
VPN = 98,5%

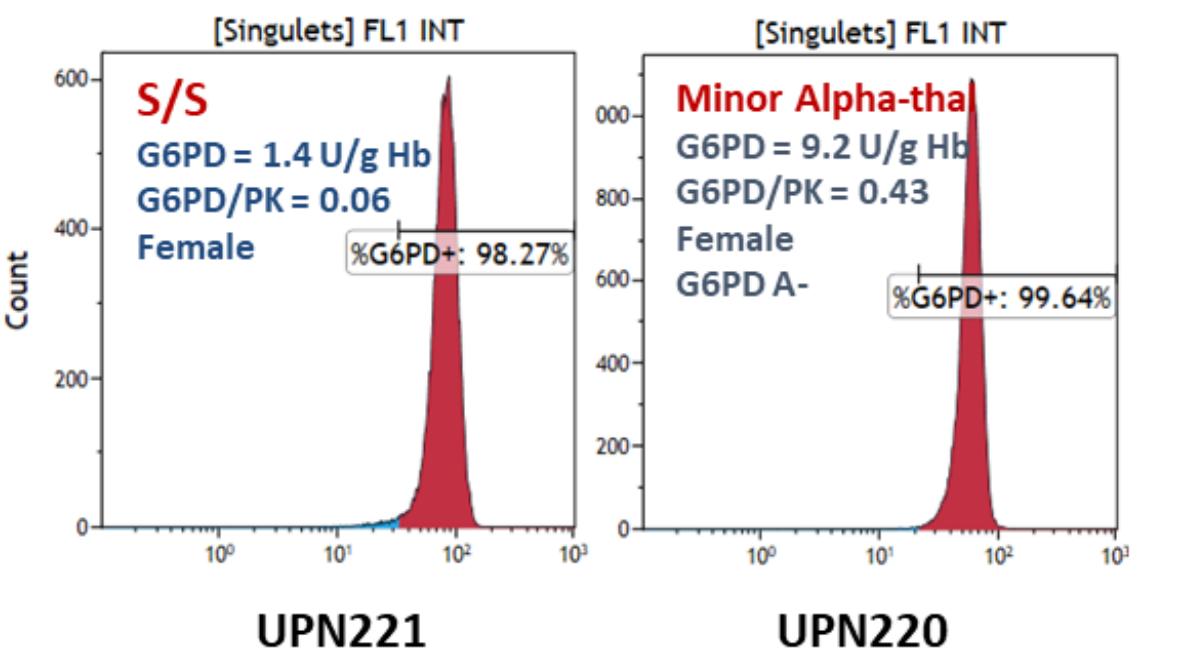


Performances du test par CMF

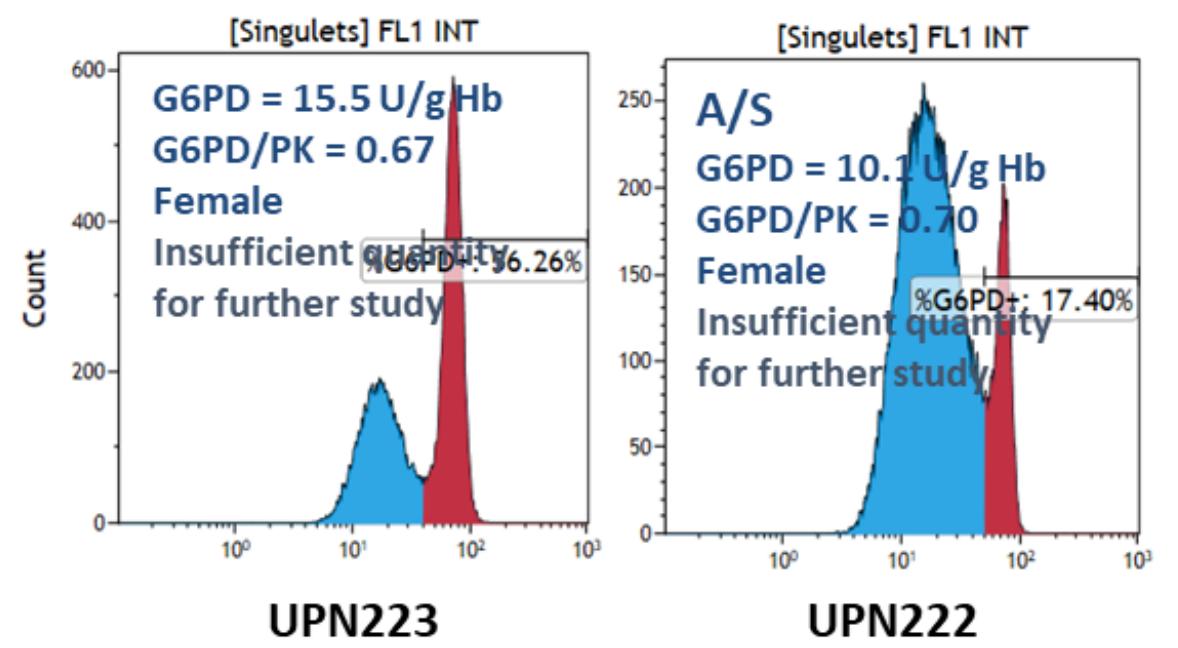
Femmes



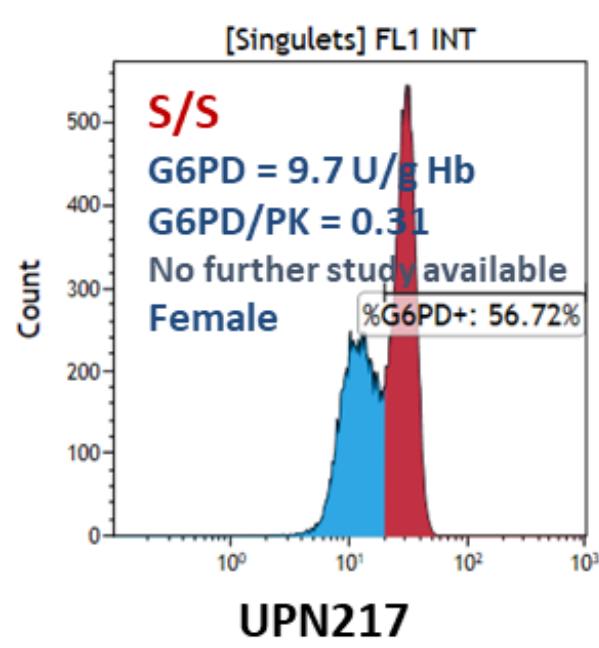
Faux négatifs



Faux positifs



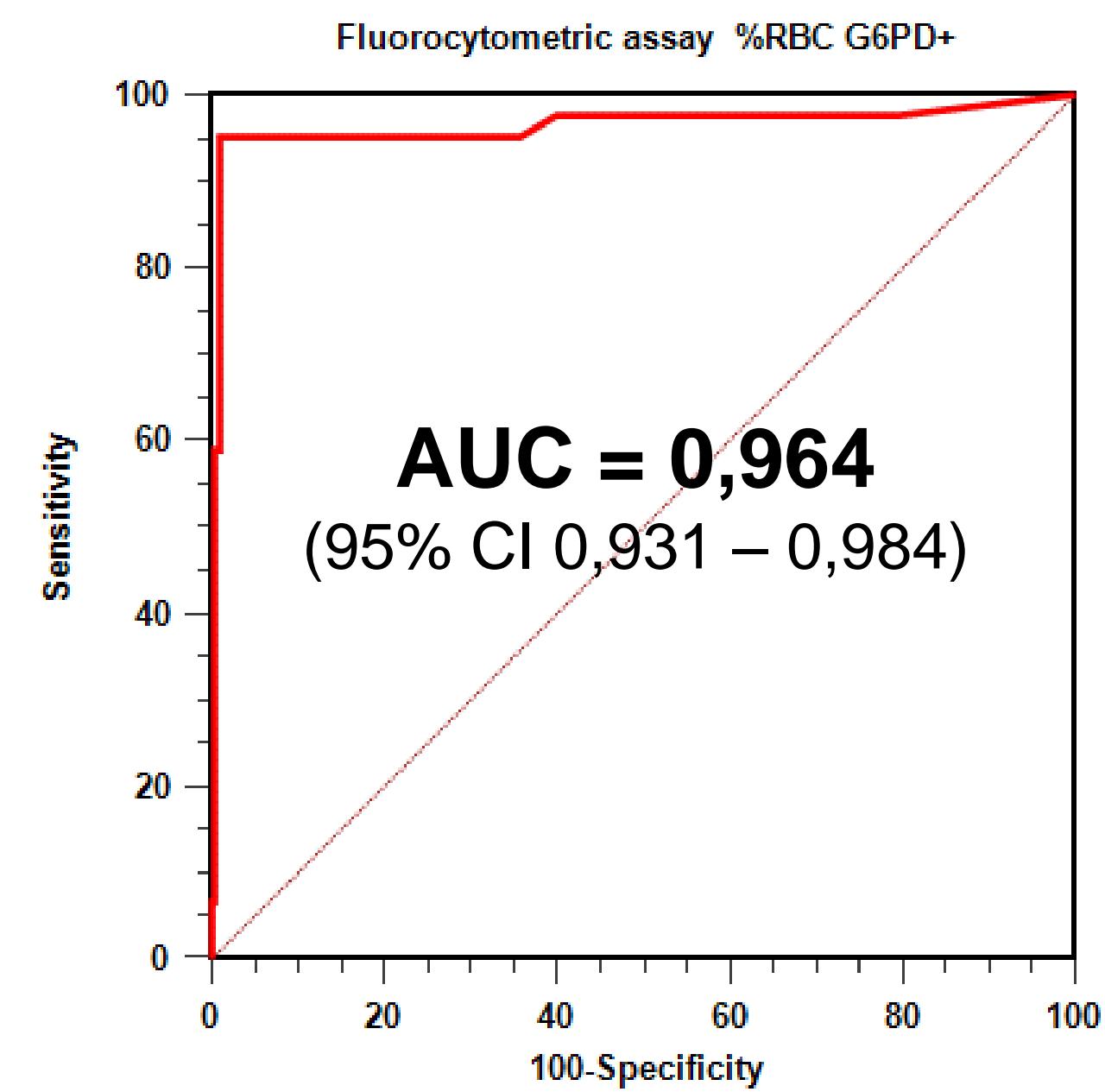
Indéterminé



		Diagnostic Final Femmes (n=265)		
		Déficit	Normal	Non exclu
CMF	Déficit	42	2	1
	Normal	2	185	24
	Profil atypique	1	7	1

Se = 95,5%
Sp = 98,9%

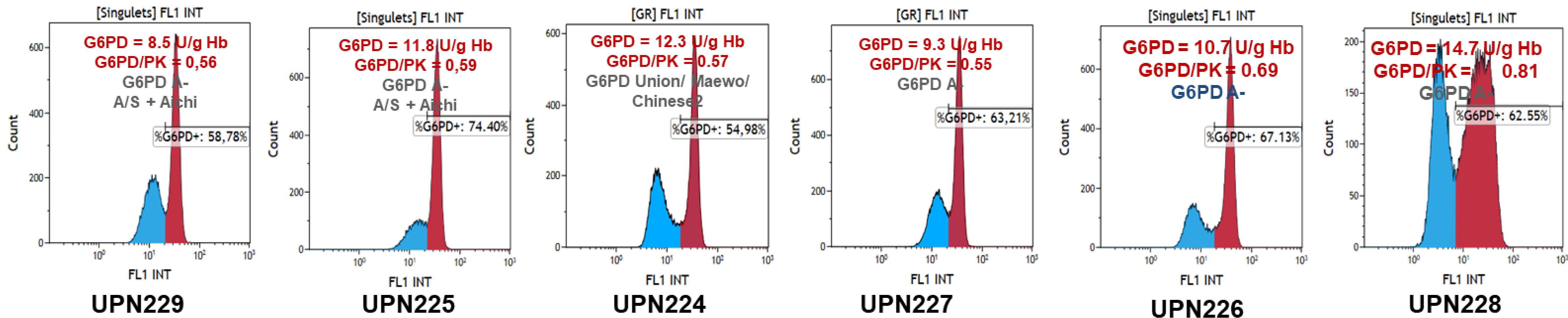
VPP = 95,5%
VPN = 98,9%



Performances du test par CMF

Femmes

6 déficits hétérozygotes identifiés **uniquement** par CMF
= Activités enzymatiques **normales**



Confirmés par Biologie Moléculaire

5 formes « A- » classiques
1 variant rare « Union / Maewo / Chinese2 »

6 / 44 déficits soit 14% des diagnostics auraient été « ratés » par Spectrophotométrie

Intérêt de dépister les hétérozygotes ?

Activité normale / subnormale

Risque d'hémolyse limité en théorie

Intérêt

Grossesse / Allaitement d'un garçon déficitaire

Diagnostic précoce de l'enfant

Primaquine

WHO et HAS

Schéma habituel : 30 mg / jour pendant 8 jours

Schéma G6PD intermédiaire : 45 mg / semaine pendant 8 semaines

Contre-indiqué si déficit sévère

Surveillance accrue

en cas d'introduction d'un traitement oxydant

G6PD par CMF - Conclusion

Avantages

- Identification aisée des **hétérozygotes**
- **Sensibilité > Spectro**
- **Peu coûteux**
- **%GR déficitaires** Prédiction du risque ?

Limites

- **Faux négatifs chez Drépanocytaires majeurs**
- Profils « **atypiques** » **ininterprétables**
- Nécessite un **cytomètre**

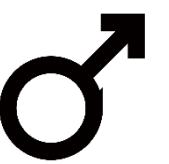
Biologie Moléculaire reste le gold standard en cas de discordance

G6PD par CMF - Conclusion

Incorporation du test en pratique CHU de Rouen

Prescription Activité G6PD

Famille connue ?
NF + Ret
CGR ?



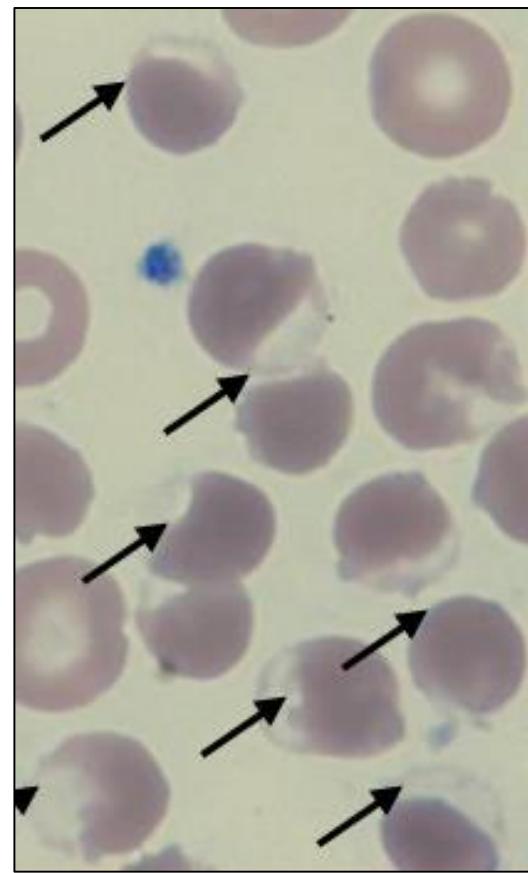
Activité **G6PD**
Activité **PK**
Ratio

Activité **G6PD**
Activité **PK**
Ratio

Résultats anormaux
+G6PD par CMF

G6PD par CMF

Take-Home Messages



Déficit en G6PD

Hémogramme normal à froid

Anémie aigue

Hémighosts possible

Signes d'alerte et facteurs d'éviction

Très rares cas d'hémolyse chronique

Déficit en Pyruvate Kinase

Anémie hémolytique chronique

Suivi spécialisé

Biologie Moléculaire

Gold Standard pour trancher
A faire si PK diminuée

Spectrophotométrie

A distance de transfusion
Influence Ret / CCMH
Ratios ↑ performances

Femmes : 20% de faux négatifs

Cytométrie en flux

Diagnostic facile des hétérozygotes
Evaluation %GR déficitaires
Faux-négatifs dans Drépanocytoses

Remerciements

CHU de Rouen

Techniciennes Globules Rouges

Céline BOCQUET

Edwige BRARD

Caroline CHATELLIER

Cécile CONTE

Emilie ROUSSEAU

Biologistes Hématologie

Maïssa SOUISSI

Elsa BERA

Catherine BOUTET

Agnès LAHARY

Henri Mondor, Créteil

Biochimie

Stéphane MOUTEREAU

Génétique

Serge PISSARD

ORIGINAL ARTICLE Accepted: 10 September 2024

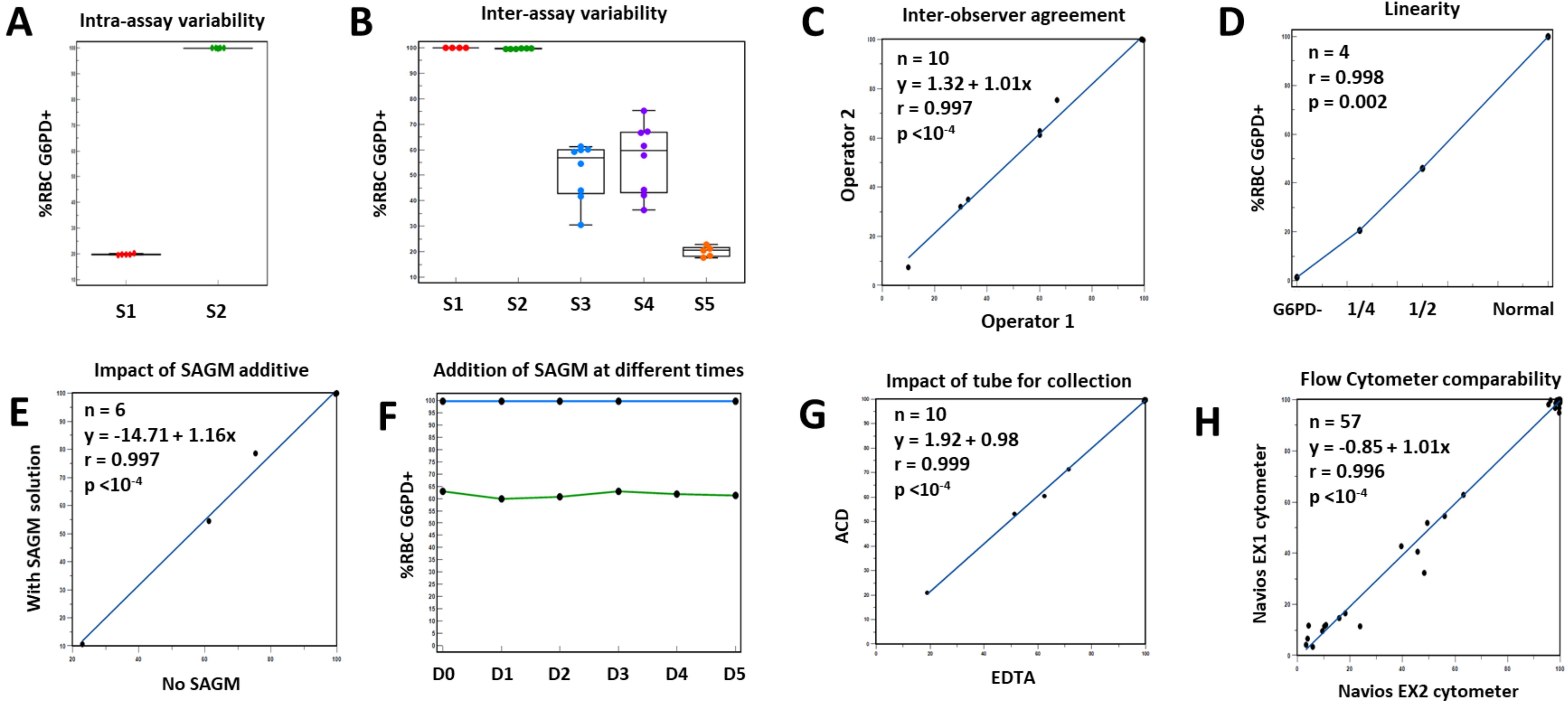
CLINICAL CYTOMETRY WILEY

Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency detection using fluorocytometric assay: Evaluation after 1 year of clinical implementation

M. Souissi¹ | E. Bera¹ | C. Boutet¹ | C. Chatellier¹ | C. Conte¹ | E. Brard¹ |
C. Boquet¹ | E. Rousseau¹ | S. Pissard^{2,3} | A. Lahary¹ | V. Bobée¹ 

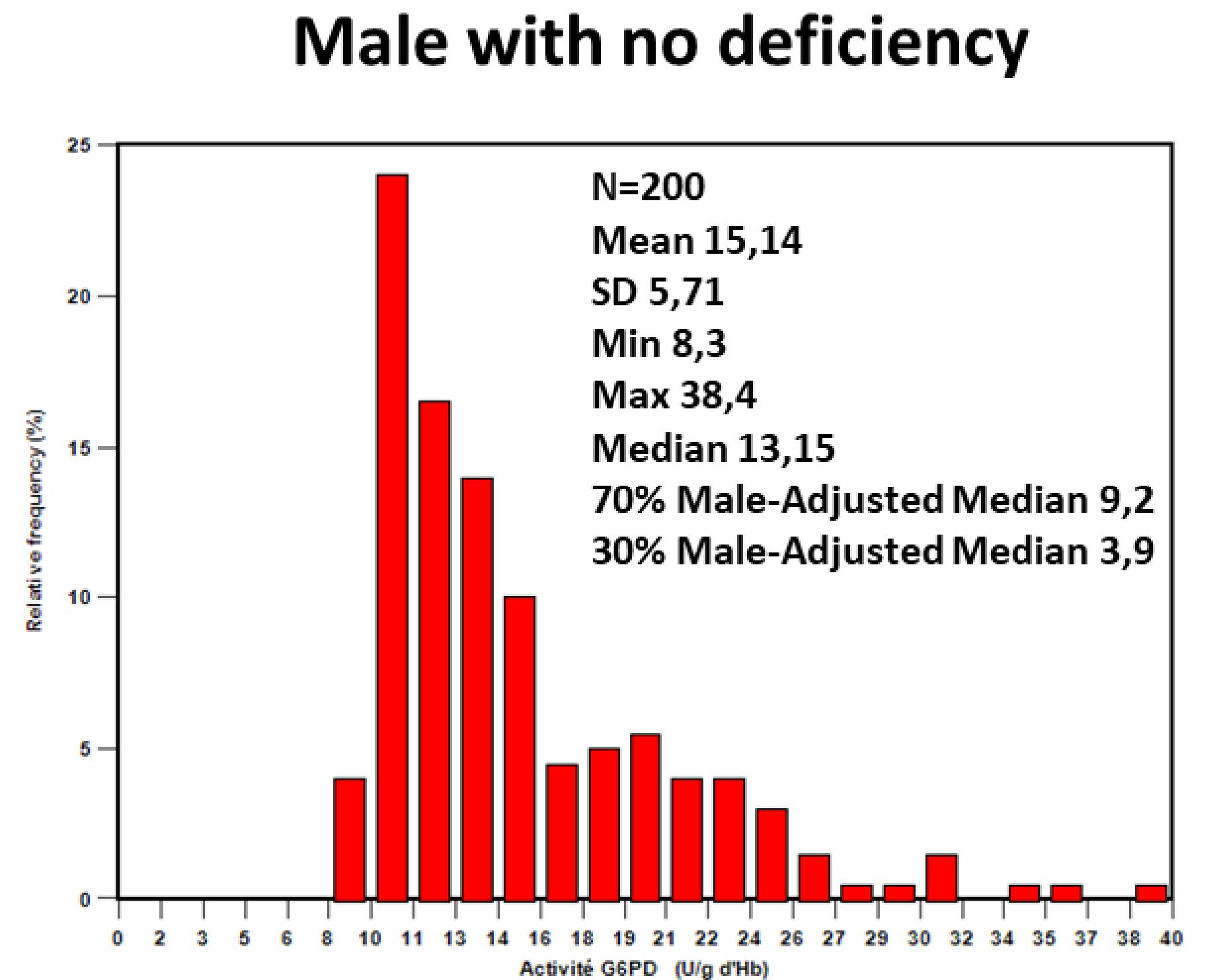
victor.bobee@chu-rouen.fr

Validation de Méthode – G6PD par CMF

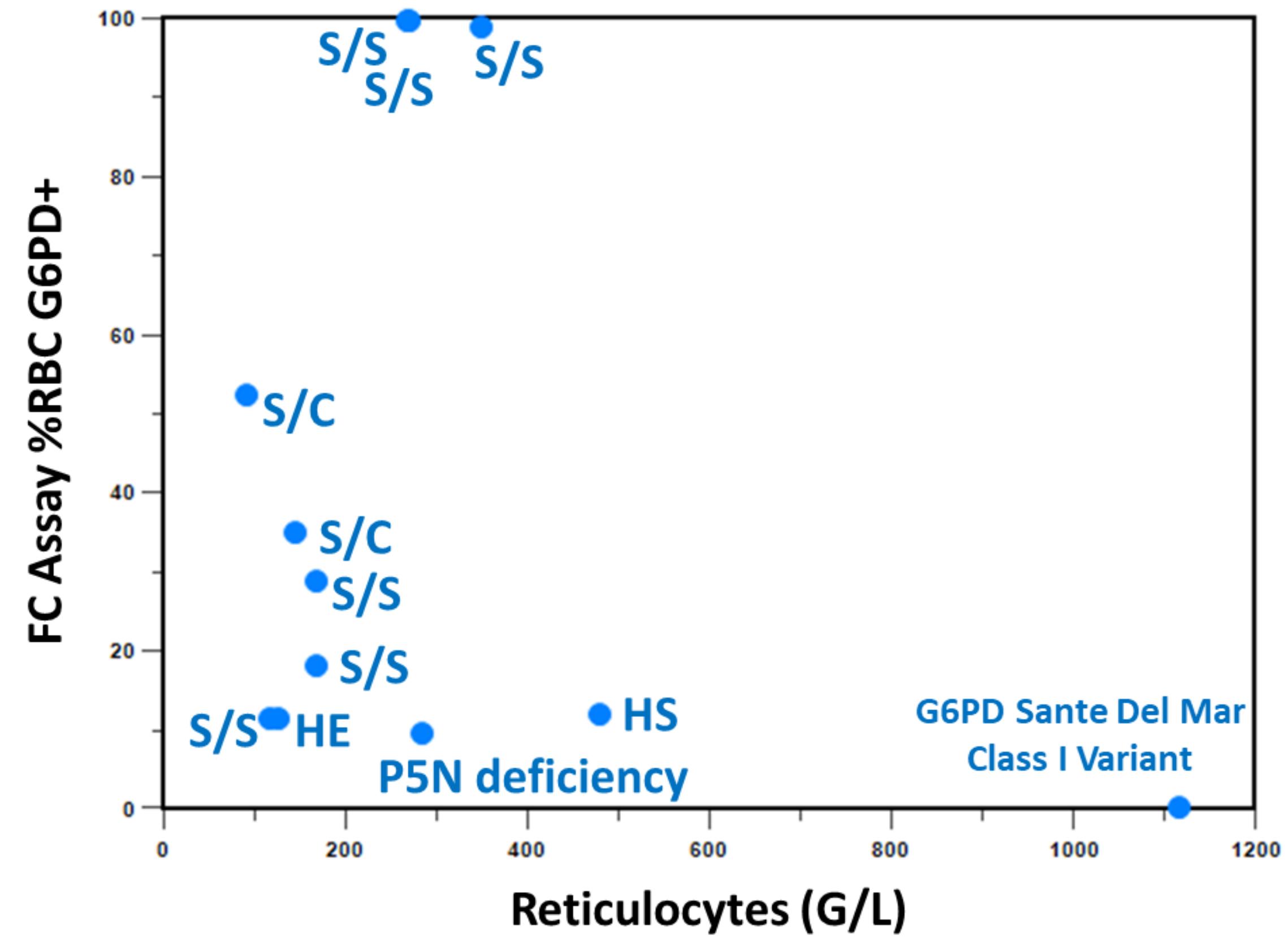


Répartition des activités

Médiane chez les hommes sans déficit



Patients avec hémolyse chronique



Impact de l'âge sur l'inactivation du X

