

BIO MED



LES JOURNÉES POUR L'AVENIR DE LA BIOLOGIE MÉDICALE

MERCREDI 14
& JEUDI 15 MAI
2025

Diagnostic des déficits enzymatiques du globule rouge

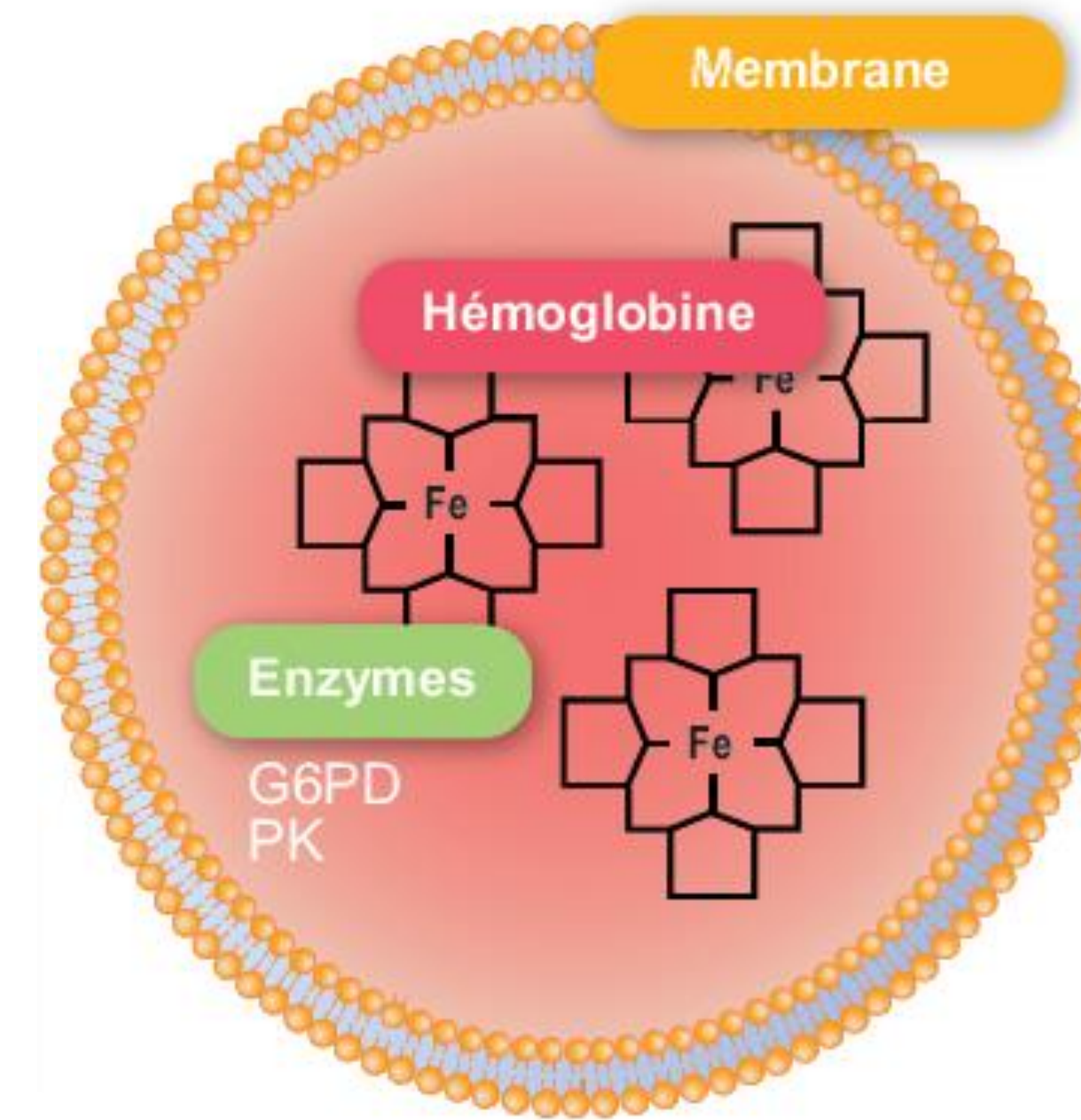
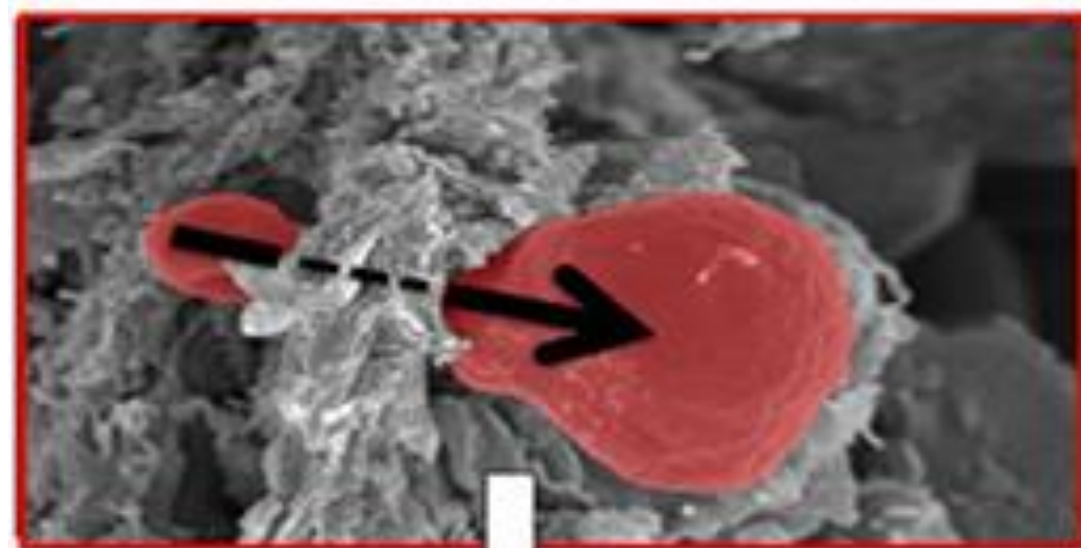
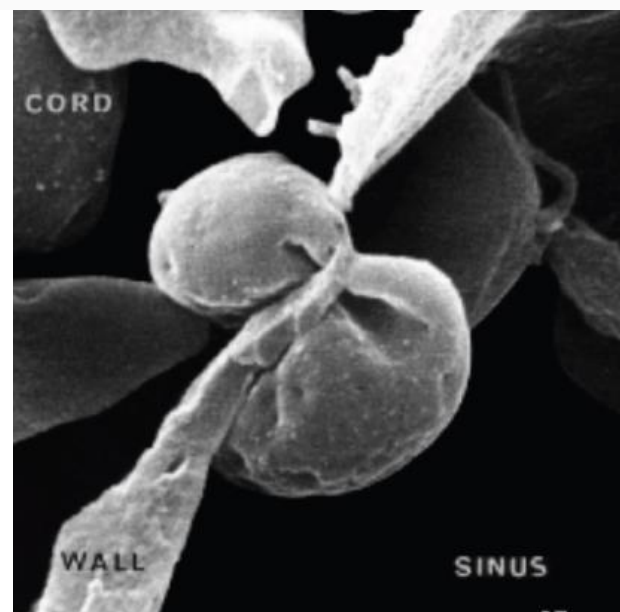
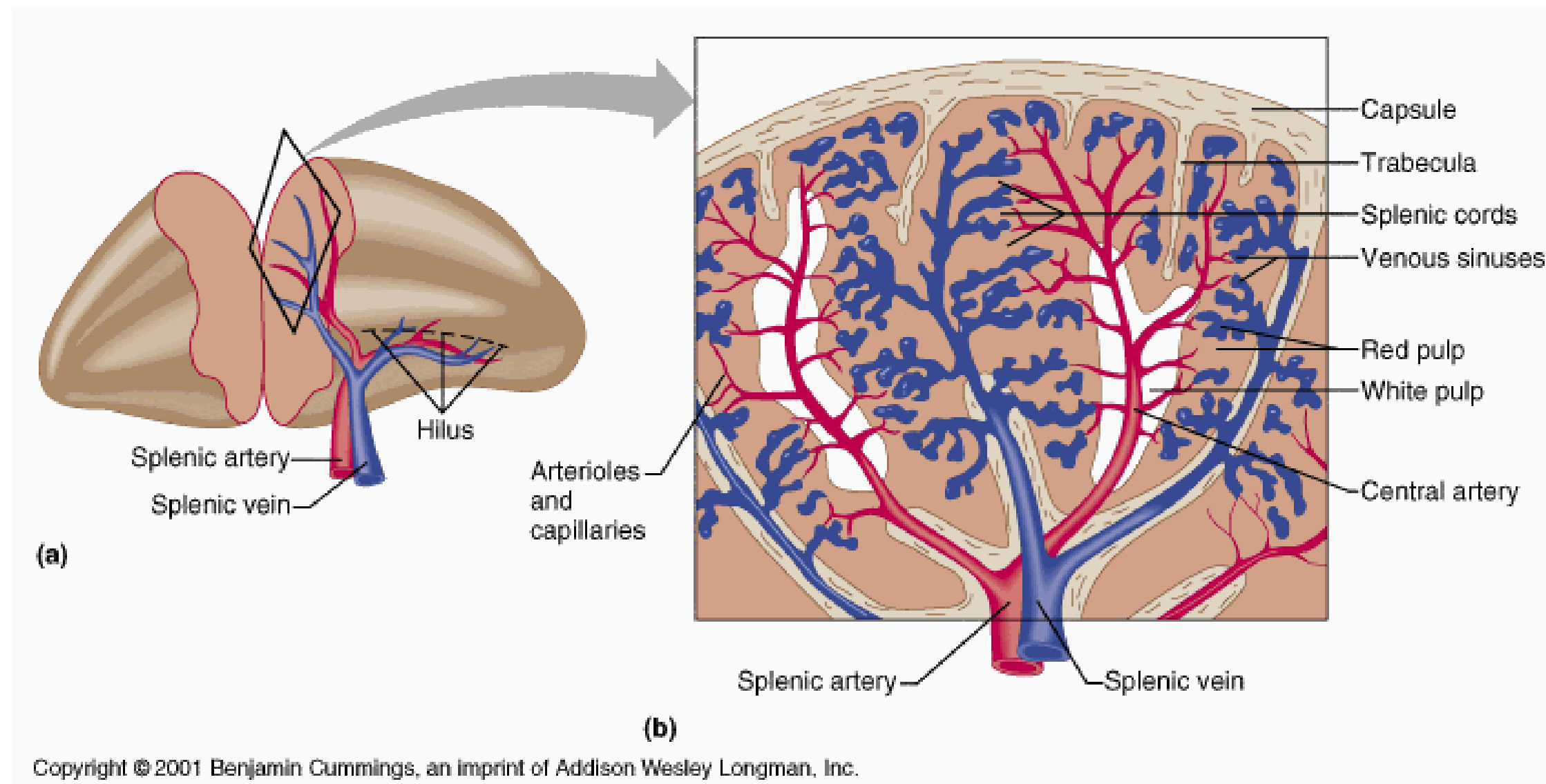
Victor BOBEE-SCHNEIDER
Laboratoire d'Hématologie
CHU de Rouen

CHU
ROUEN NORMANDIE

Survie du globule rouge

Physiologie

- Circulation périphérique pendant **120 jours**
 - Passe **14 000 fois** dans la rate
- Cordons spléniques** aux **sinus spléniques**



Métabolisme du GR

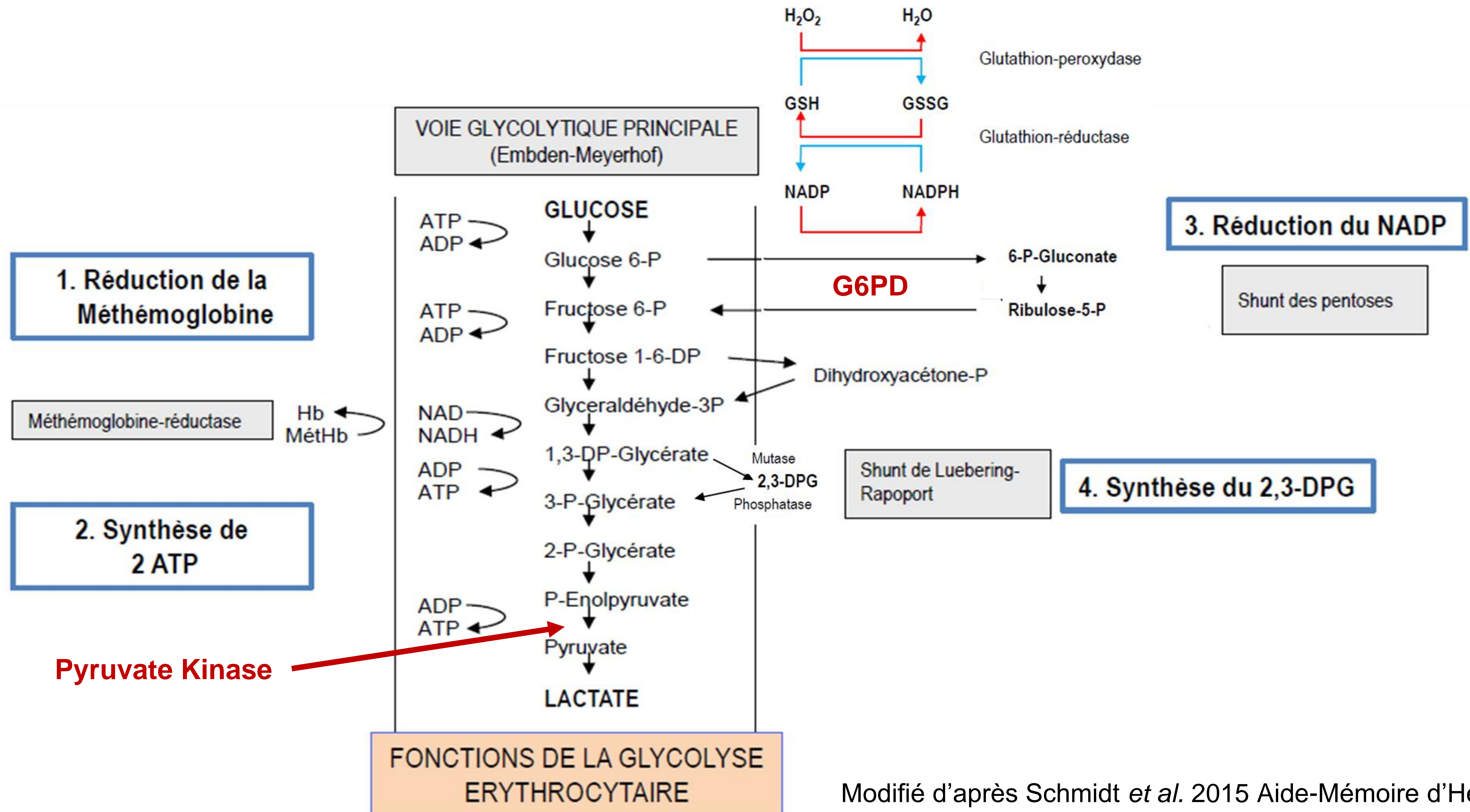
GR
« jeunes »

120 jours

GR
« âgés »

Cellule anucléée

Les métabolismes du GR



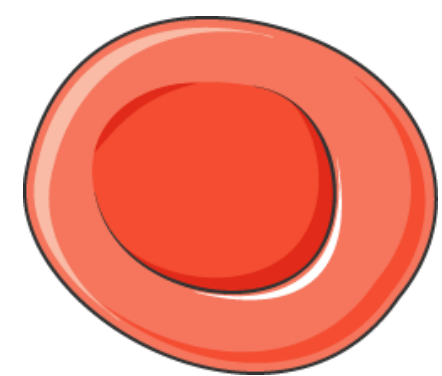
Déficit en Pyruvate Kinase

Très rare

Environ 1 cas pour 20 000 habitants

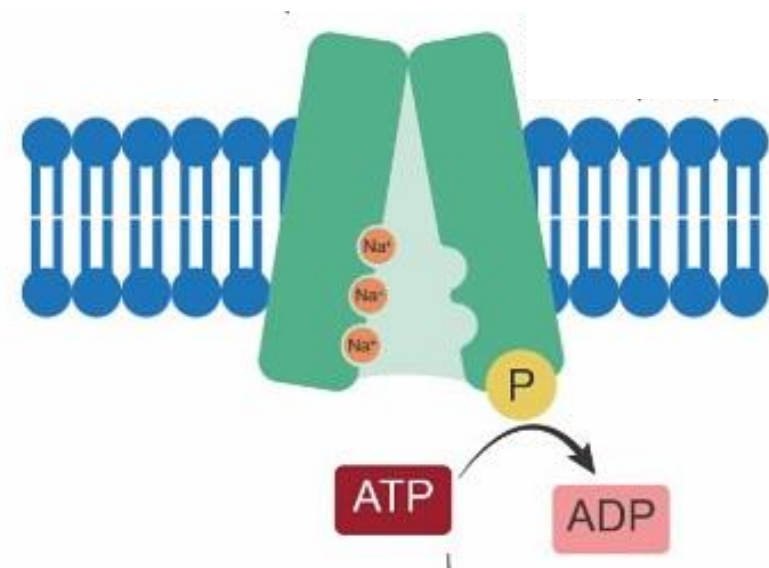
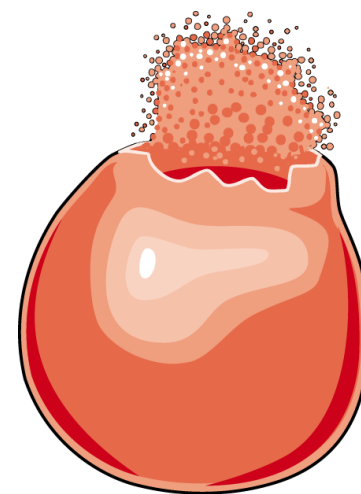
Anémie hémolytique chronique congénitale

Début néonatal le plus souvent

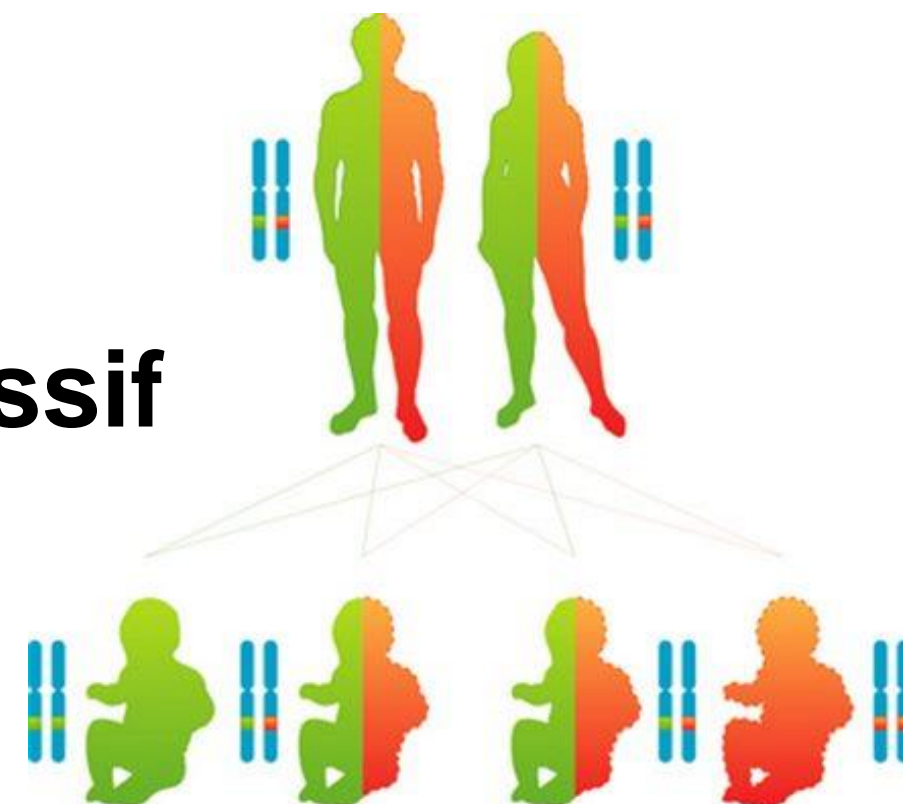


Déficit en ATP

Anomalie pompes membranaires
↳ Fluidité de la membrane



Récessif



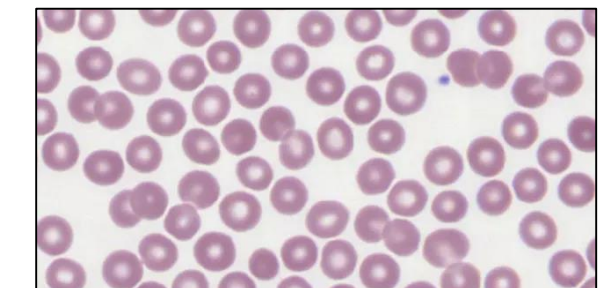
Hémogramme

Tendance macrocytaire
Hyper-réticulocytose franche



Frottis sanguin

Sans particularités



Clinique

Ictère, Splénomégalie, Lithiases
Surcharge en fer

Prise en charge

Speciafoldine, Vaccinations
Splénectomie
Activateurs de la PK









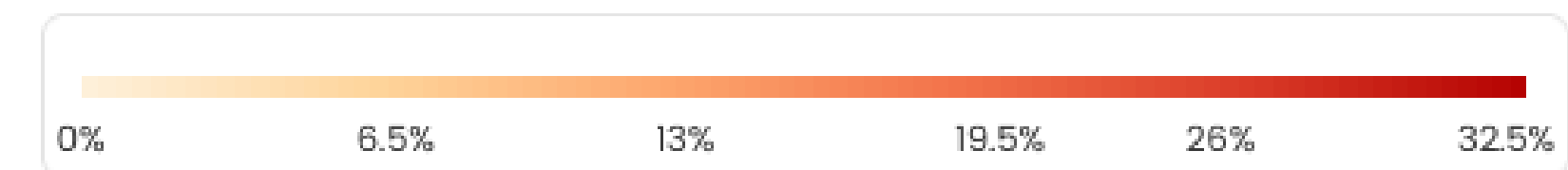
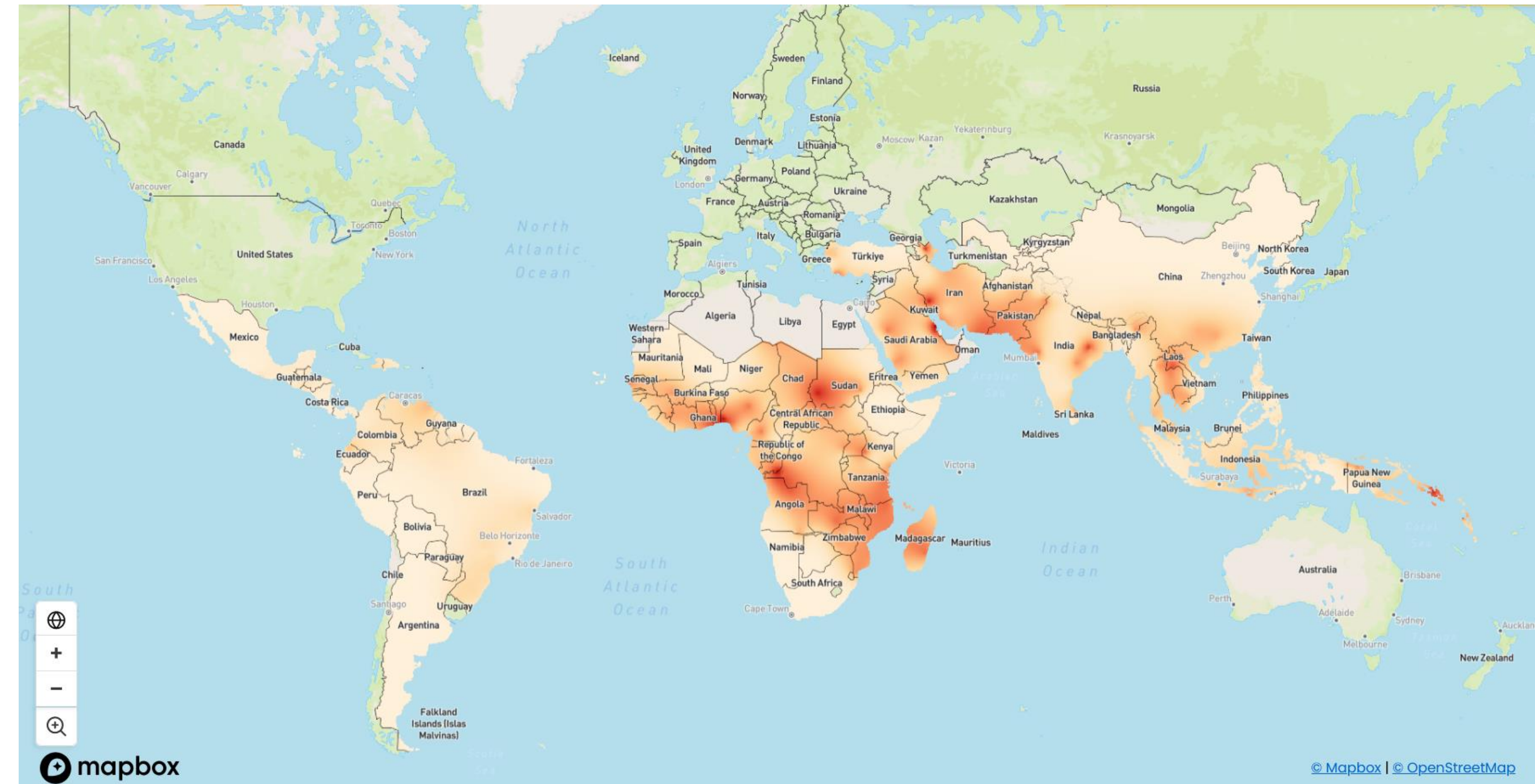
Déficit en G6PD

Très fréquent

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

Transmission liée à l'X

Garçons XY	Filles XX	Filles XX
		
100% GR G6PD-	50% GR G6PD- 50% GR G6PD+	100% GR G6PD-
Activité 	Activité 	Activité 

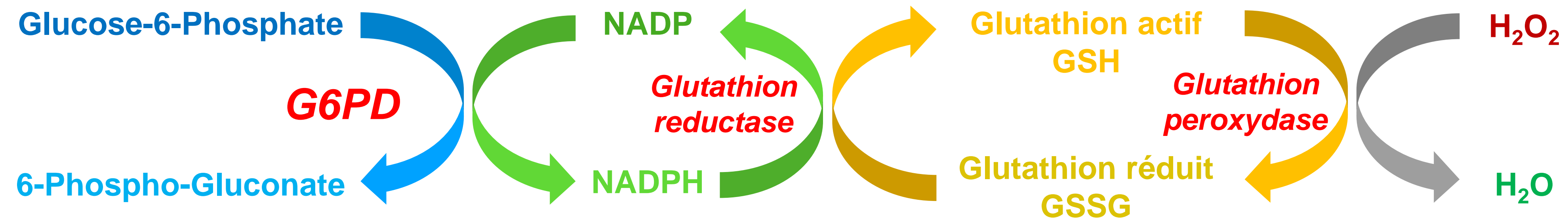


Lyonisation
Inactivation aléatoire d'un chromosome X

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 aiguë G6PD-

Anémie aiguë

Profondeur variable
Normocytaire / Tendance macrocytaire
Hyper-réticulocytose

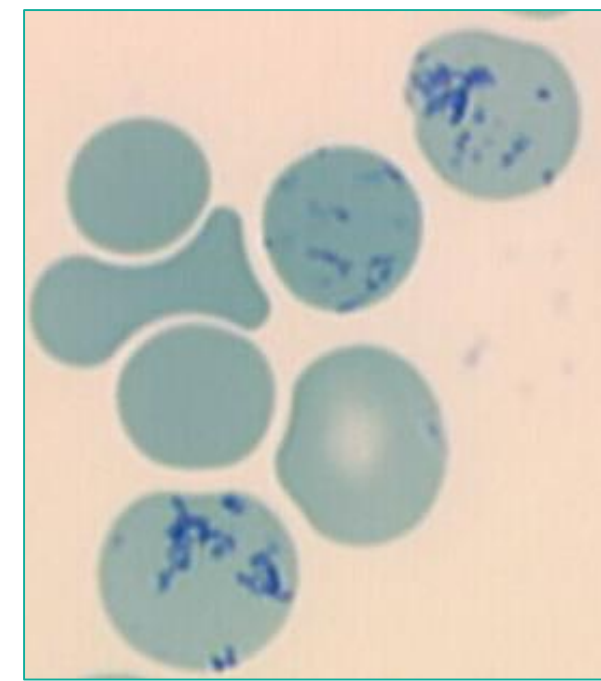
Frottis sanguin

Le plus souvent sans particularités
Rarement **Hemighosts**

Signes d'hémolyse intravasculaire

LDH \nearrow
Haptoglobine $\searrow \searrow \searrow$
Insuffisance rénale aiguë

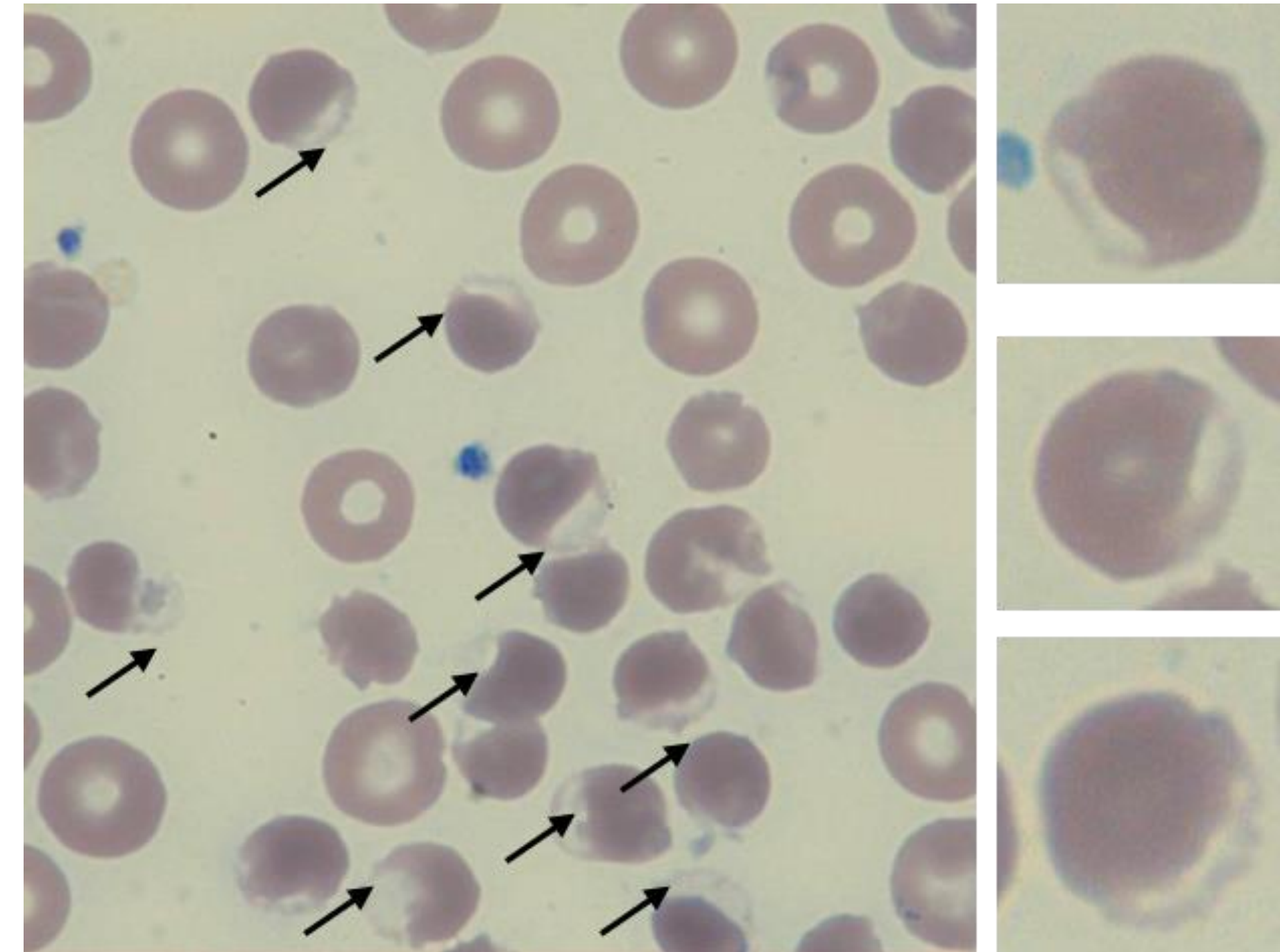
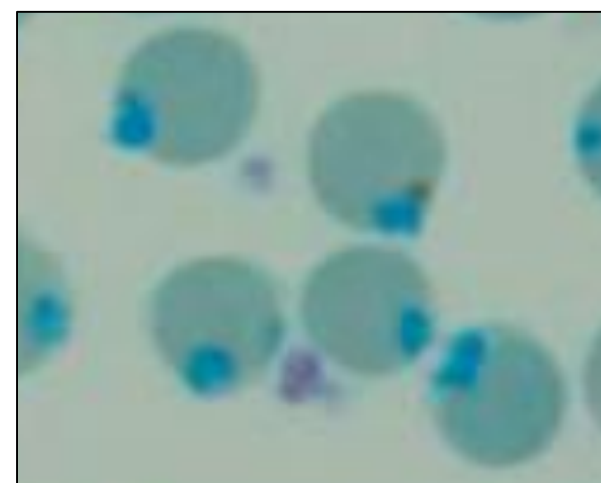
Asthénie / Ictère
Hémoglobinurie
Urines « Porto » / « Coca-cola »
Douleurs abdominales/lombaires atypiques



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

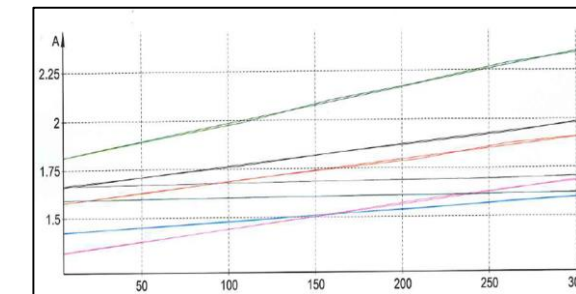
Vaccinations à jour

Carte de soins et d'urgence



Diagnostic des déficits enzymatiques du GR

Activités enzymatiques par Spectrophotométrie



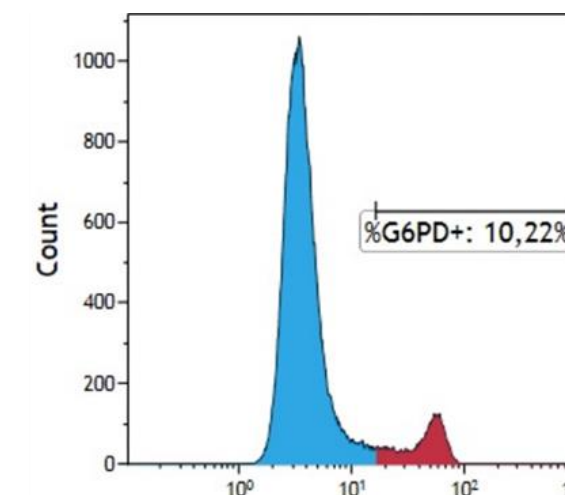
Quelques jours

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

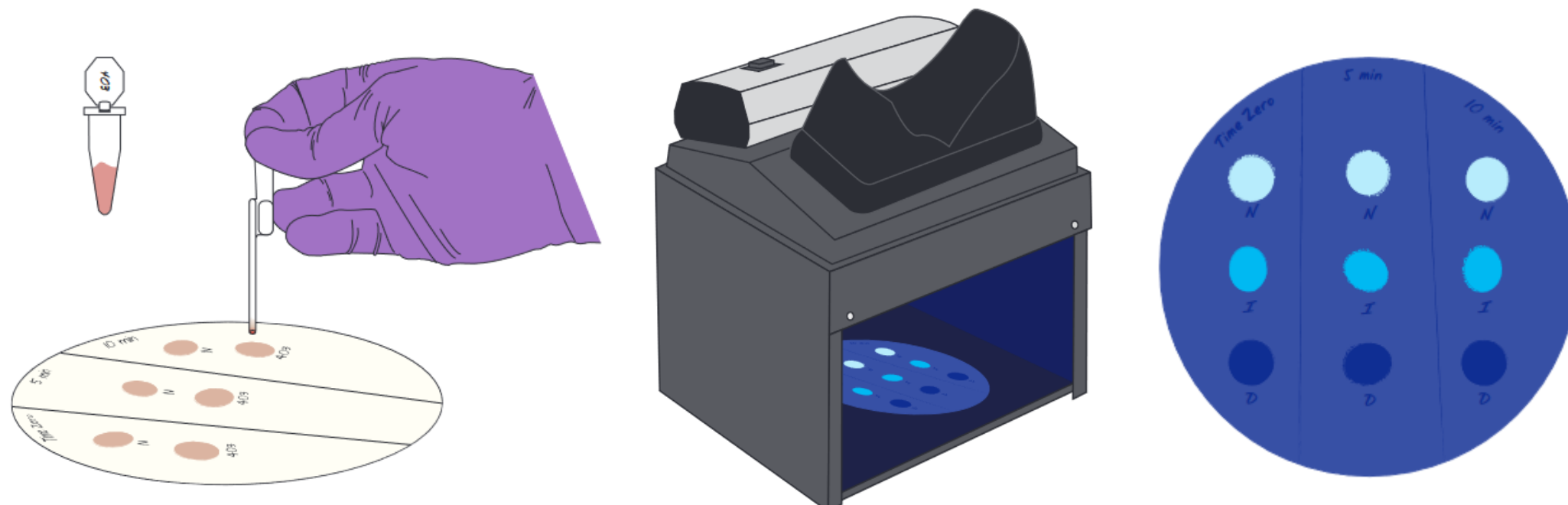


Se = 68%

Sp = 100%

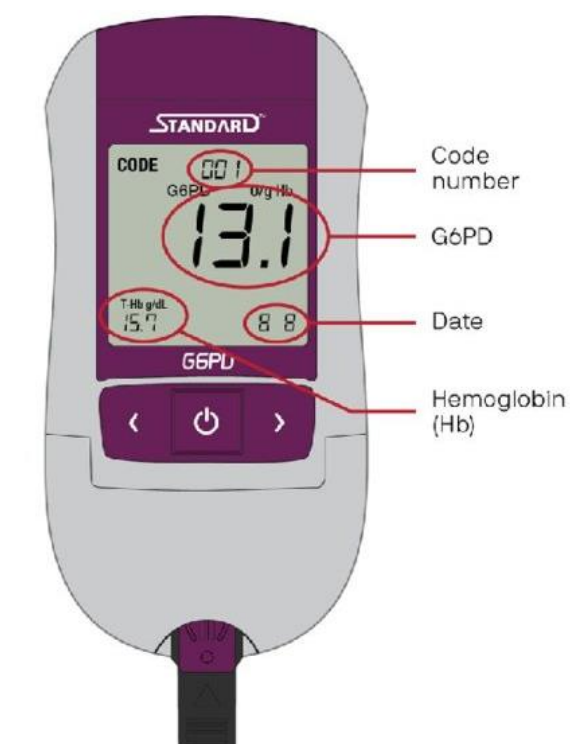
Kim et al. 2011 Plos One

Fluorescence Spot Test



Résultats quantitatifs

SD Biosensor



**Méta-analyse
>2000 patients**

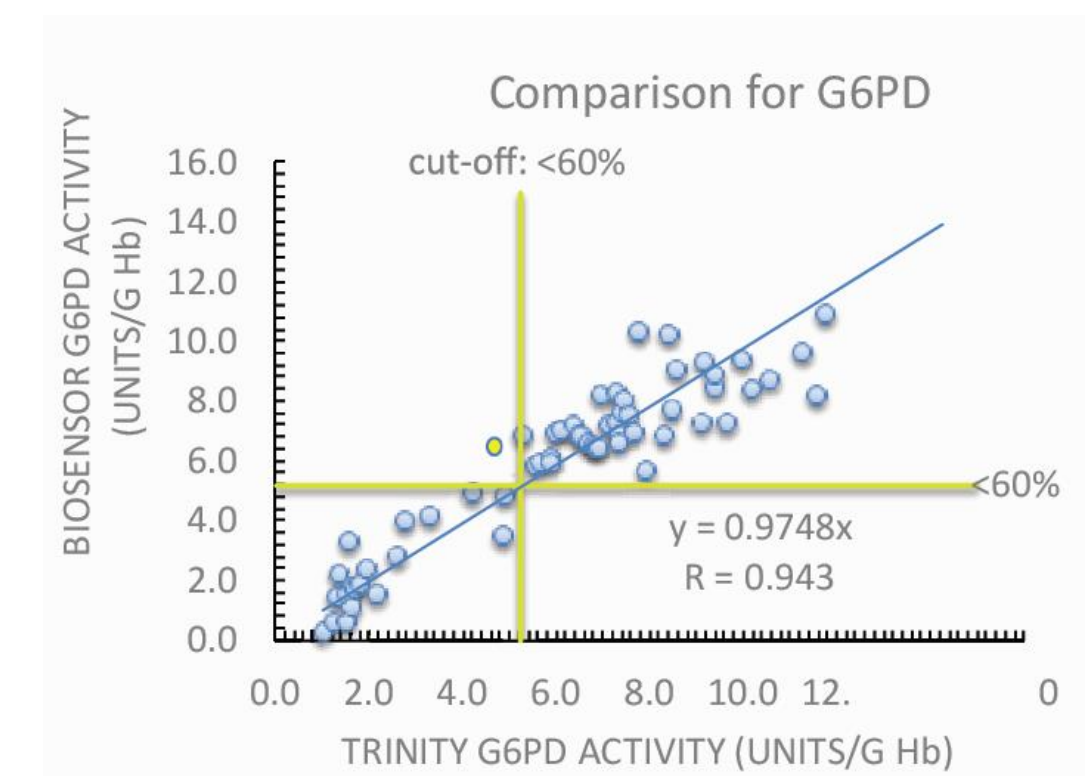
Se >95%

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

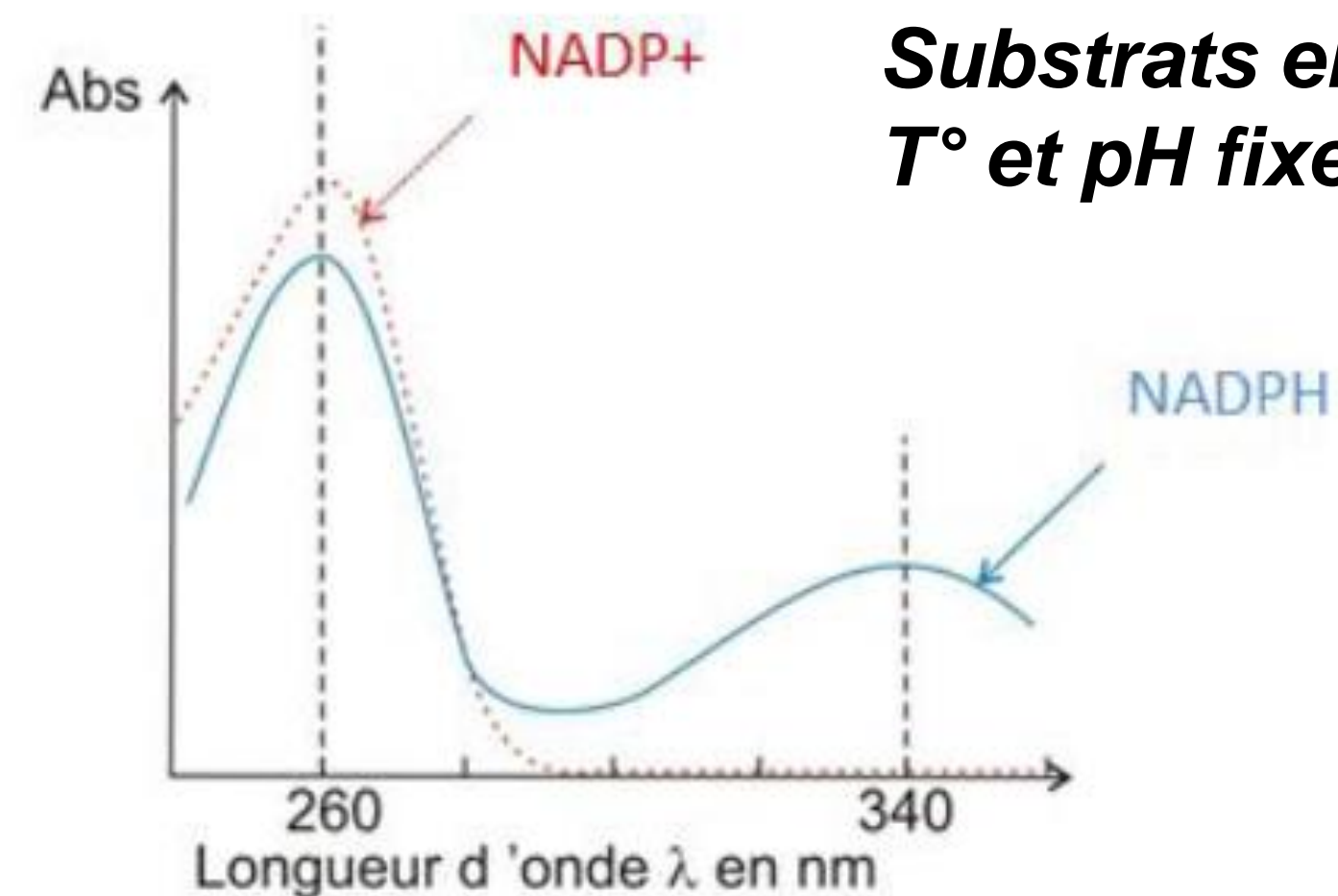
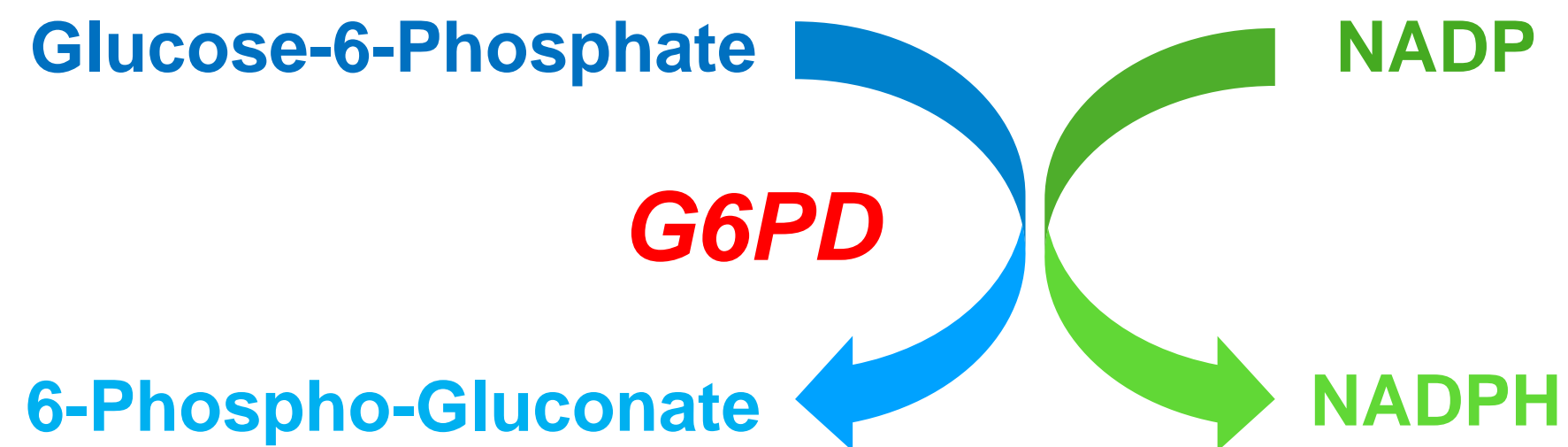


EDTA
+4°C

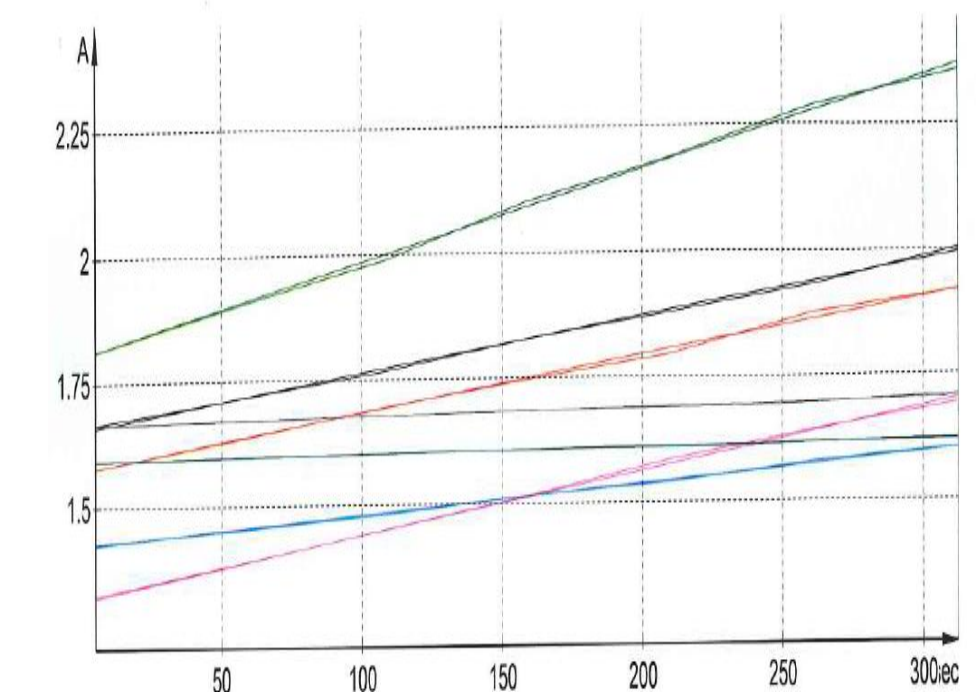
A partir d'un culot de Globules Rouges

Lavages / Centrifugation

Résines de cellulose



Substrats en excès
T° et pH fixes

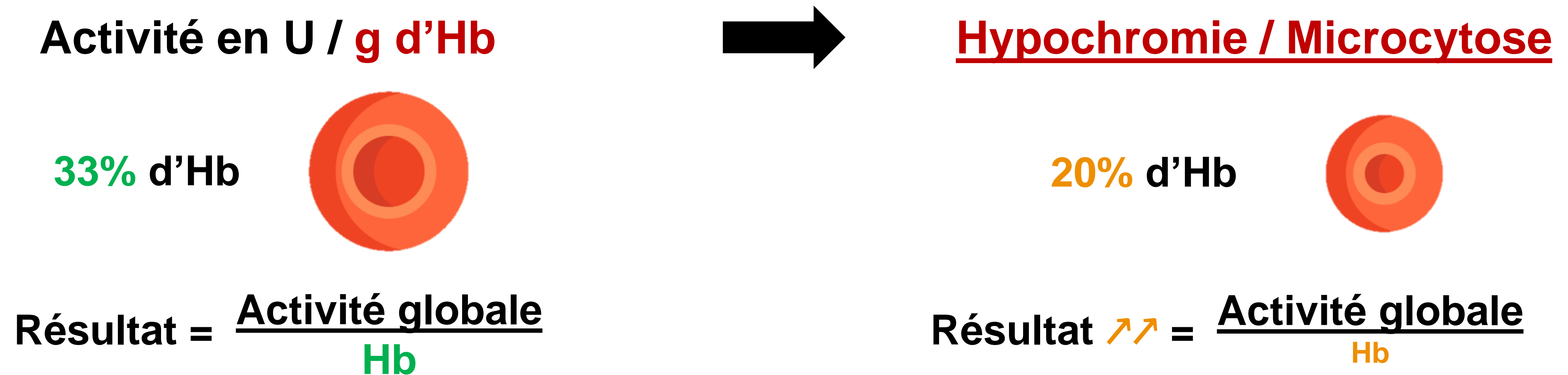
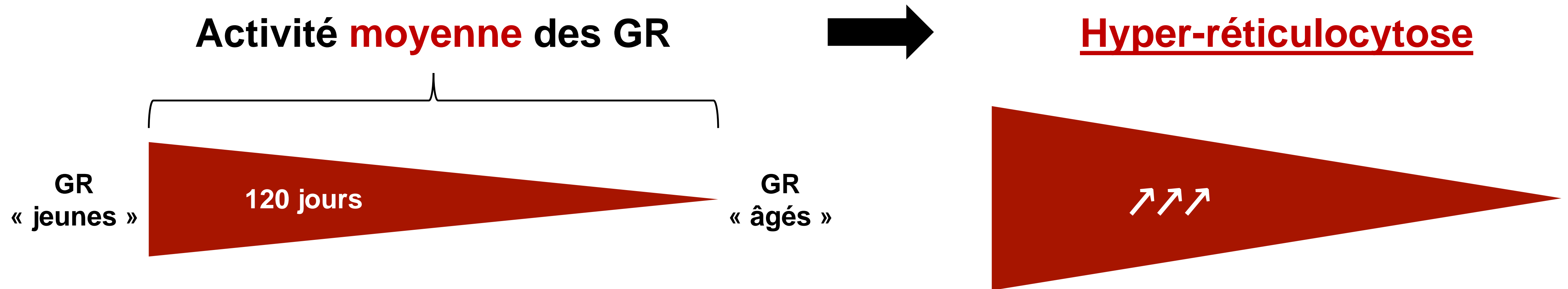


Activité en U / g d'Hb

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

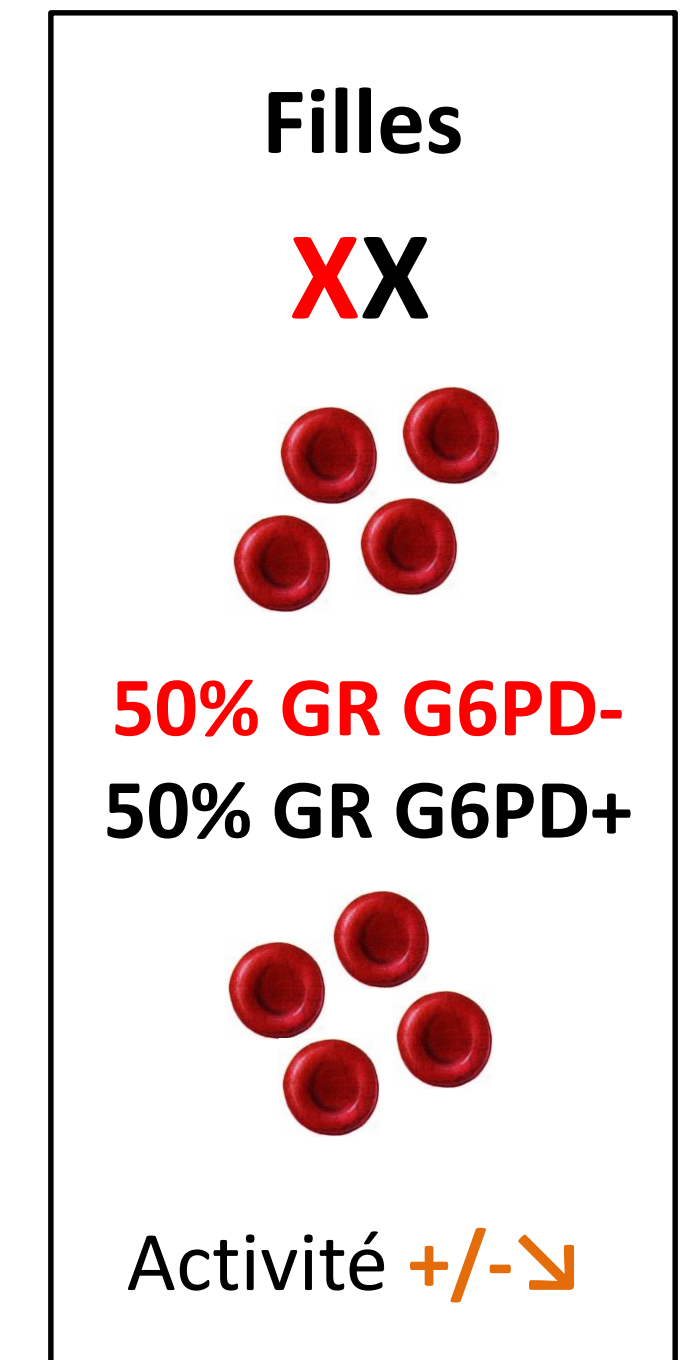
Sexe féminin XX

Normalisation via des ratios

Permet de s'affranchir des interférences du métabolisme du GR

Réticulocytes, CCMH

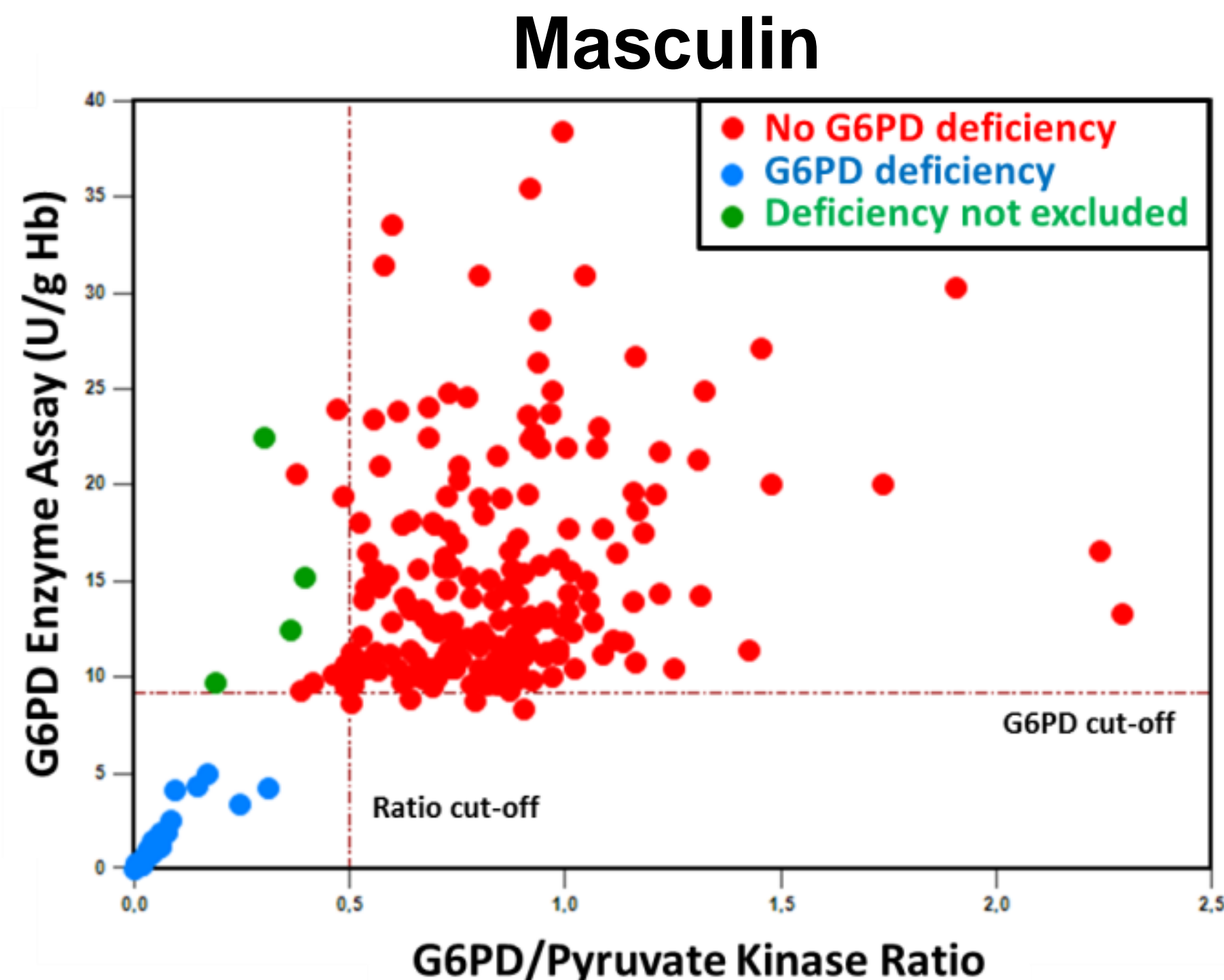
Conservation / Délai



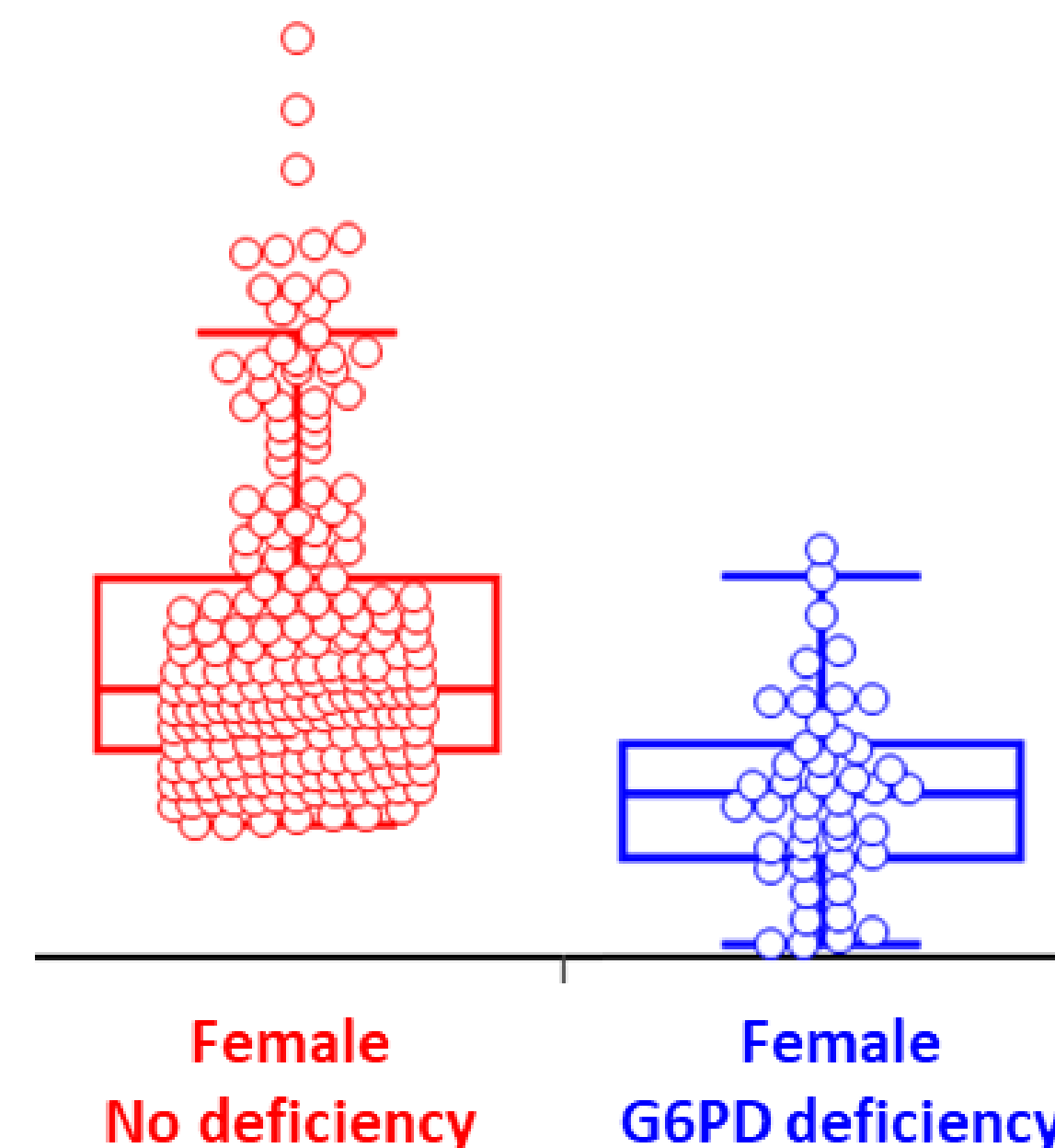
Interprétation des activités enzymatiques

Comparaison à une autre enzyme

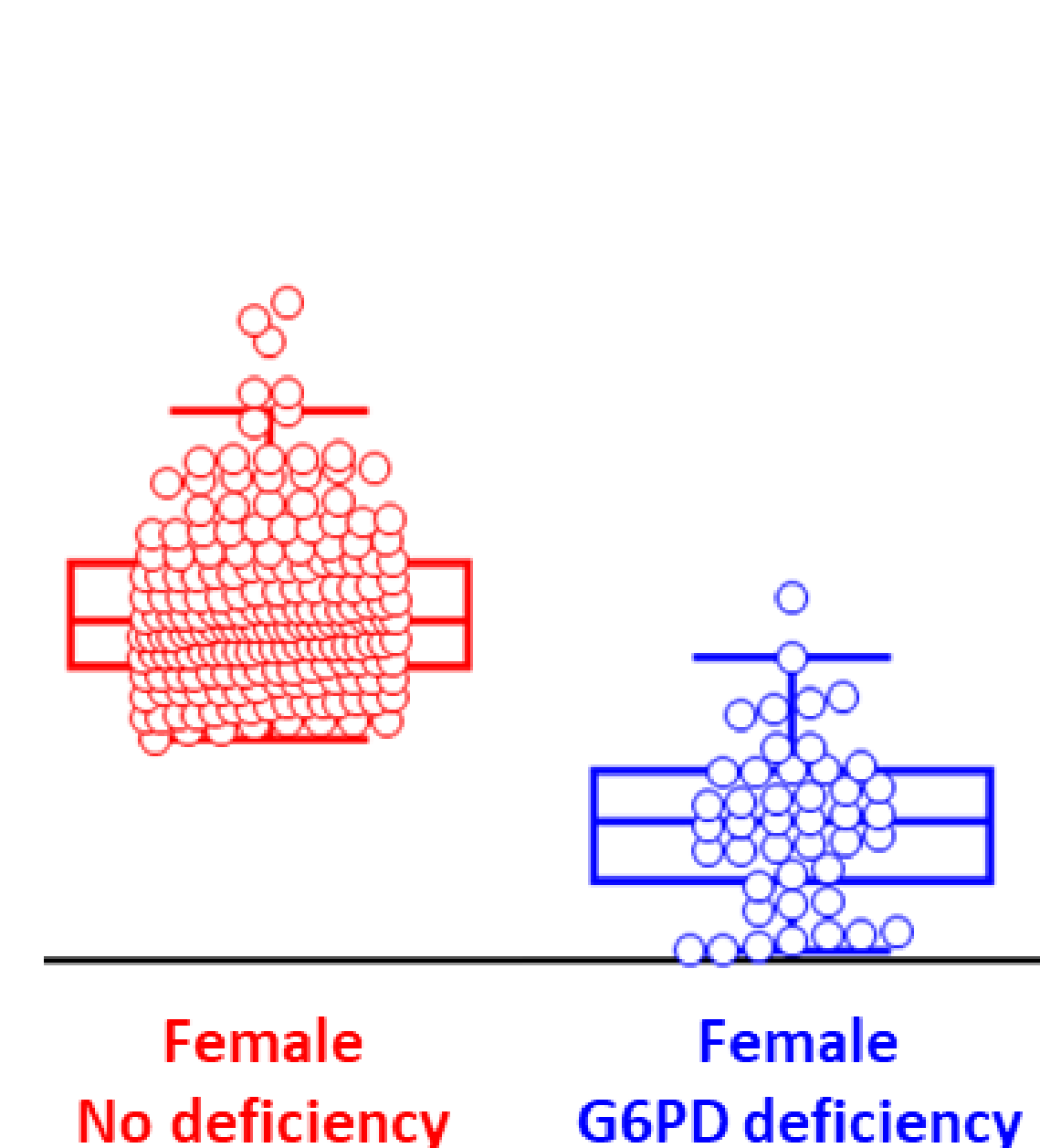
- Pyruvate Kinase
- Hexokinase / 6PGD
- ASAT / LDH érythrocytaire



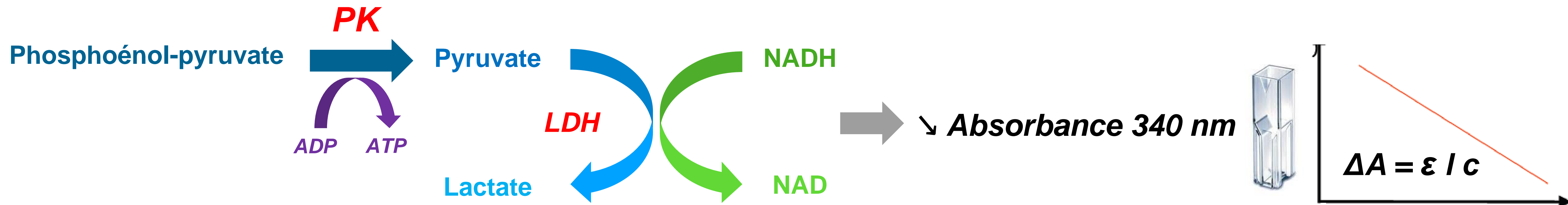
G6PD



G6PD / PK Ratio



Mesure et interprétation de l'activité PK



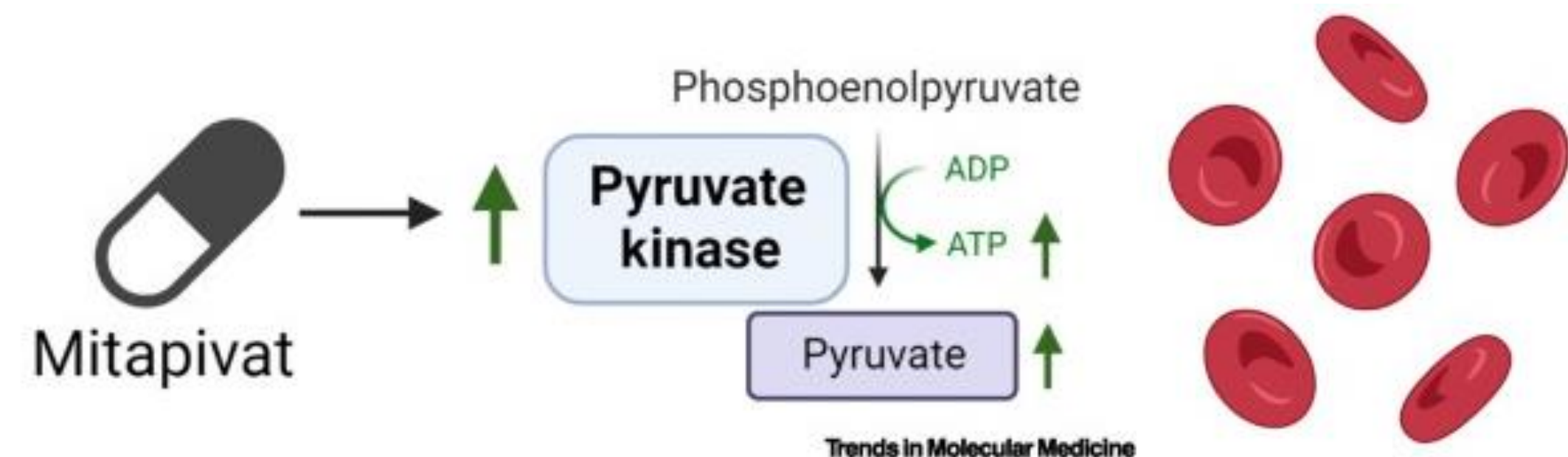
Transmission récessive

- 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



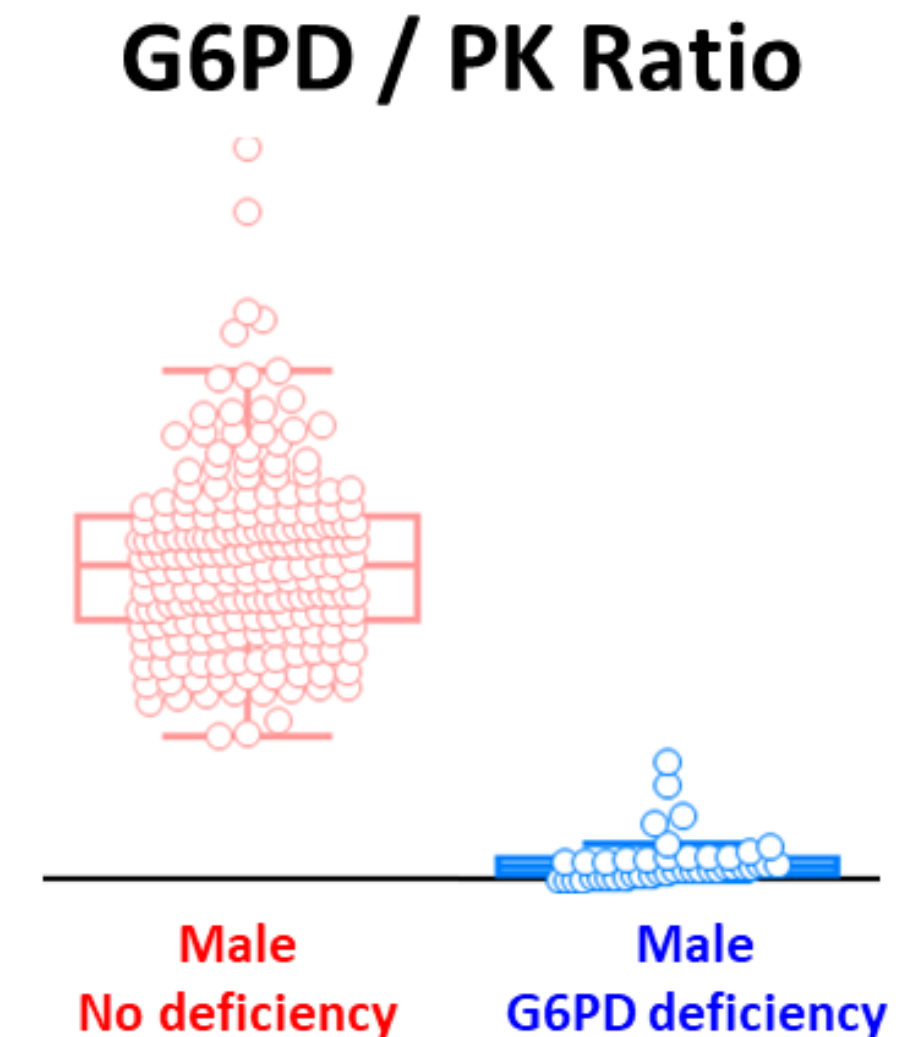
Conclusion sur les activités enzymatiques

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

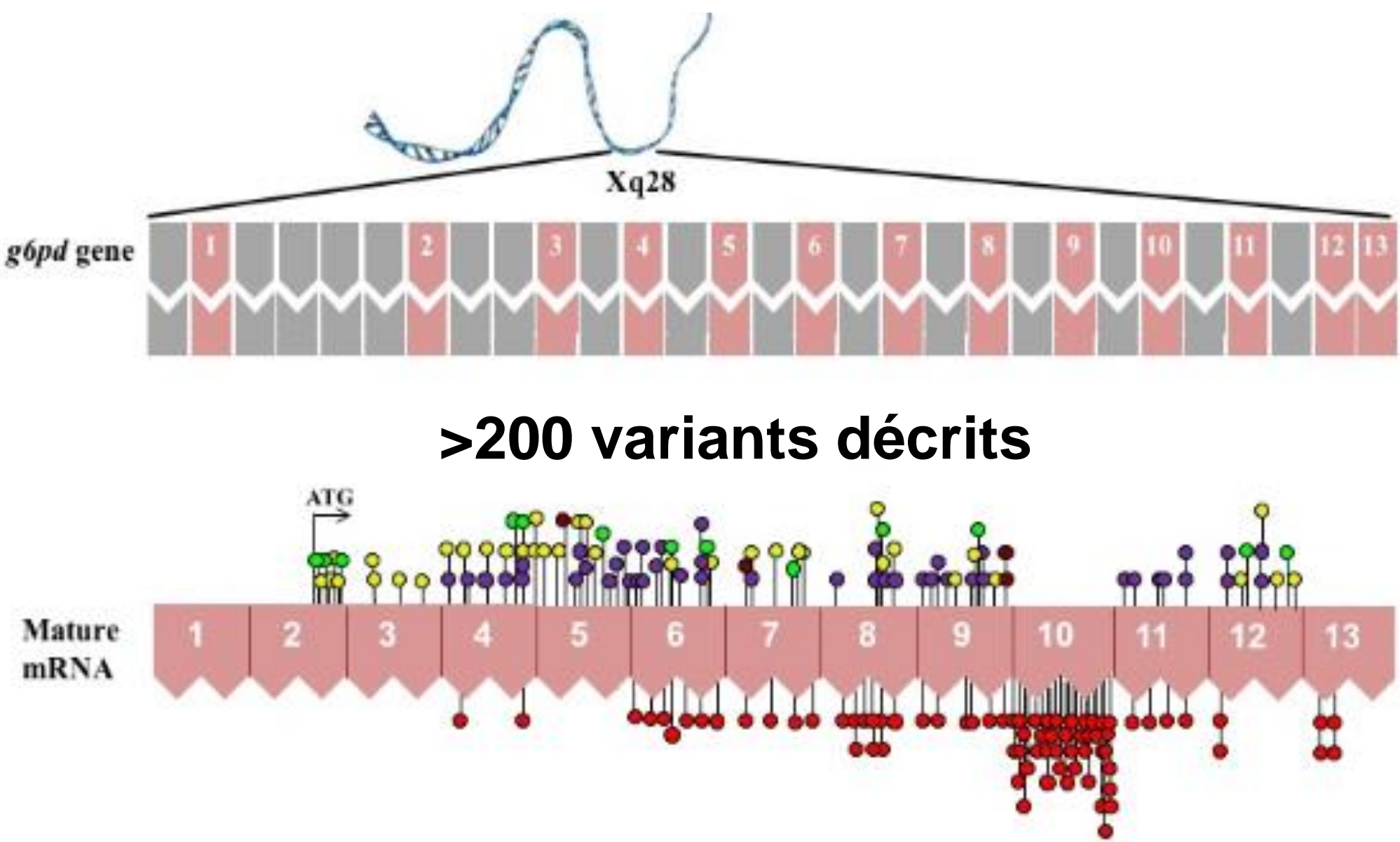
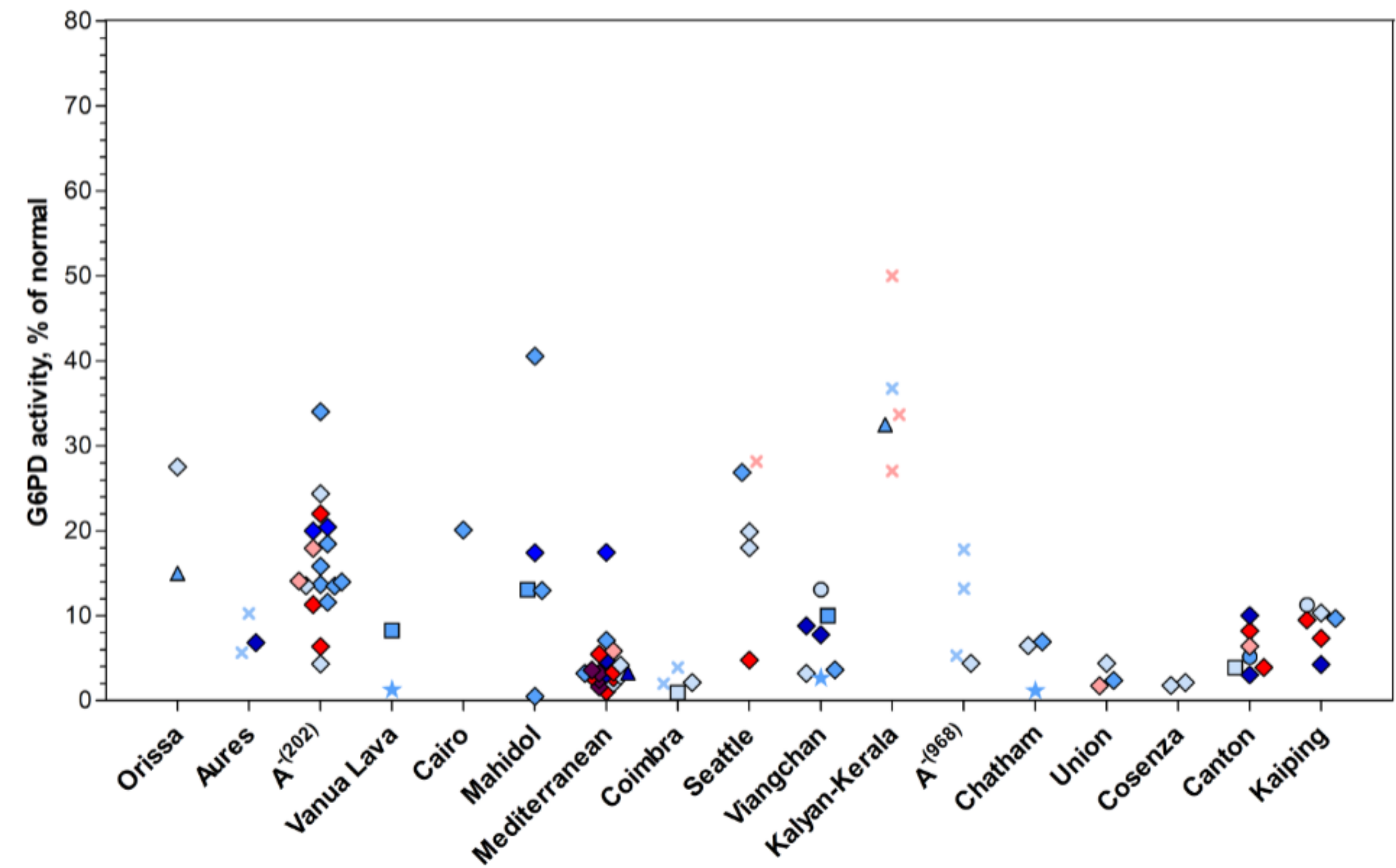
Activité très basse ou très haute => **Interprétable**

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

Transfusions multiples => **Ininterprétable**



Alternatives



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



G6PD par Cytométrie en Flux

Activité enzymatique

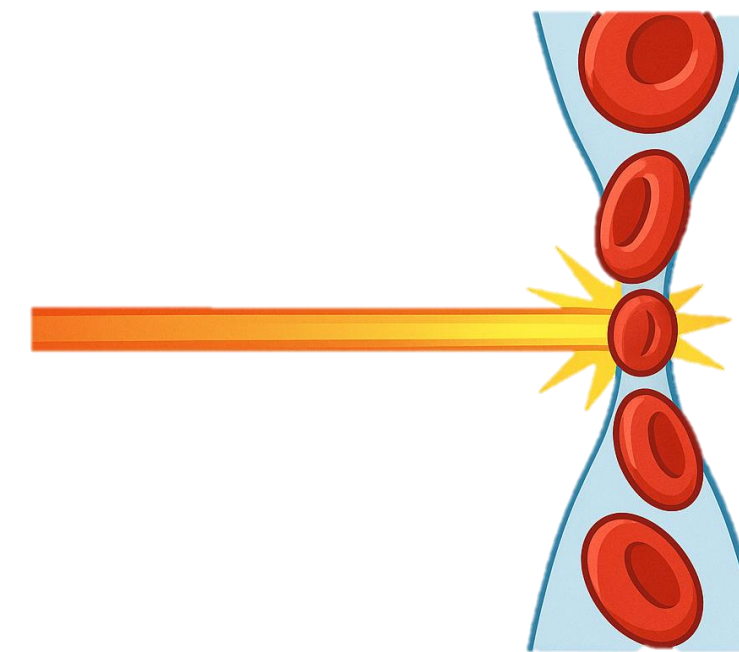
Mesure globale



Hémolysat

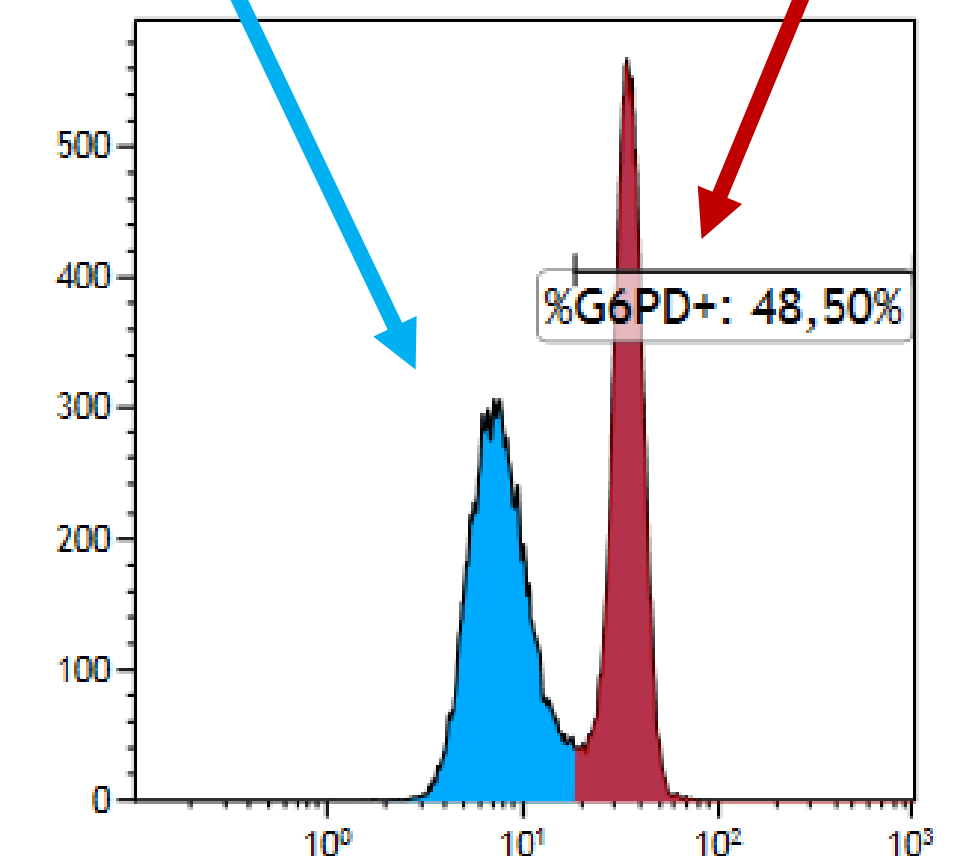
Cytométrie en flux

Analyse unicellulaire des GR



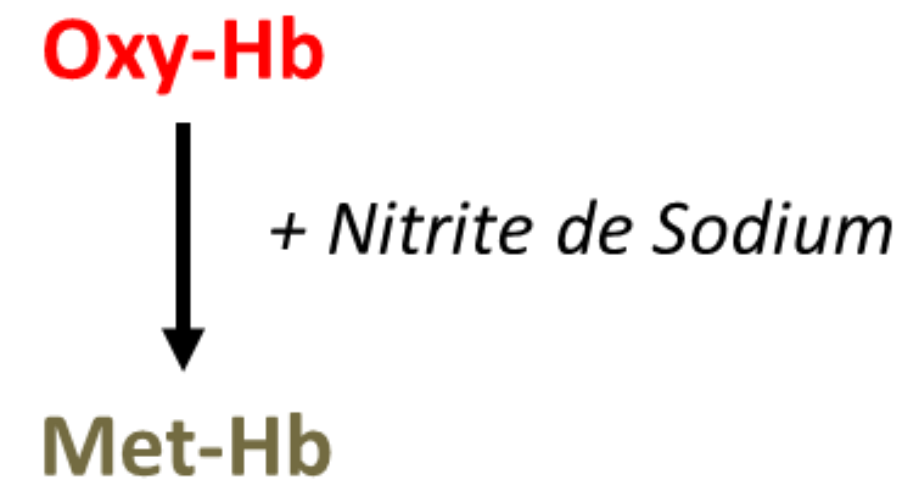
Filles **XX**

50% GR G6PD- 50% GR G6PD+



G6PD par CMF - Principe

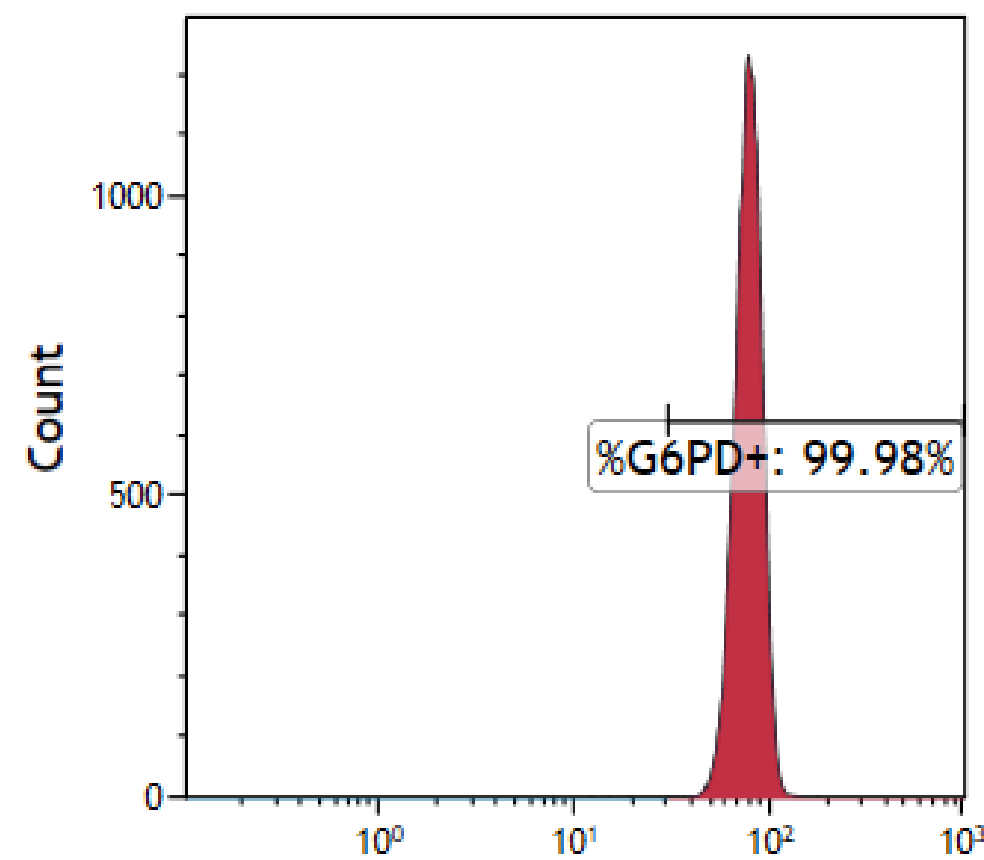
1) Oxydation de l'Hémoglobine



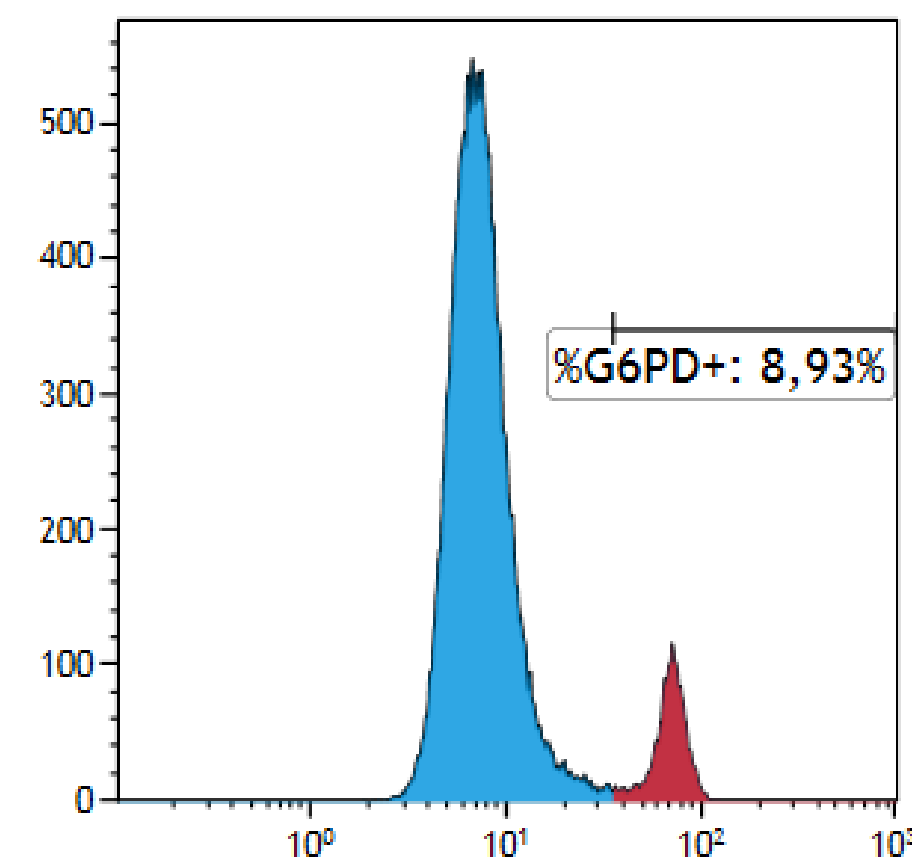
G6PD par CMF - Résultats

Statut G6PD

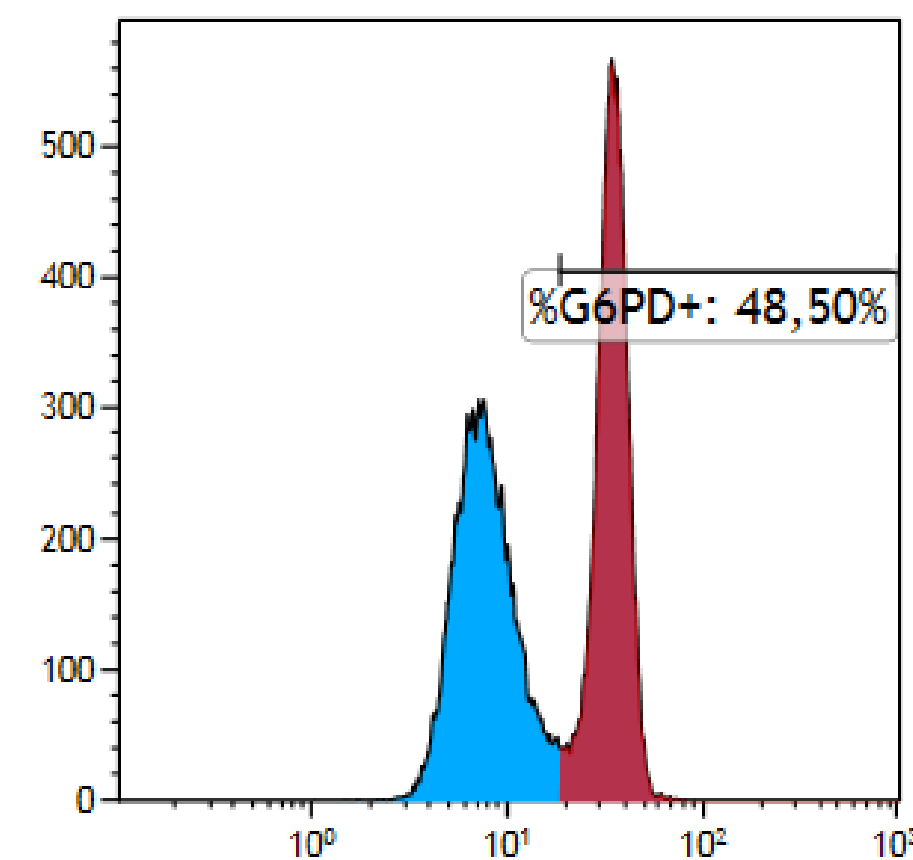
Normal



Hémizygote



Hétérozygote



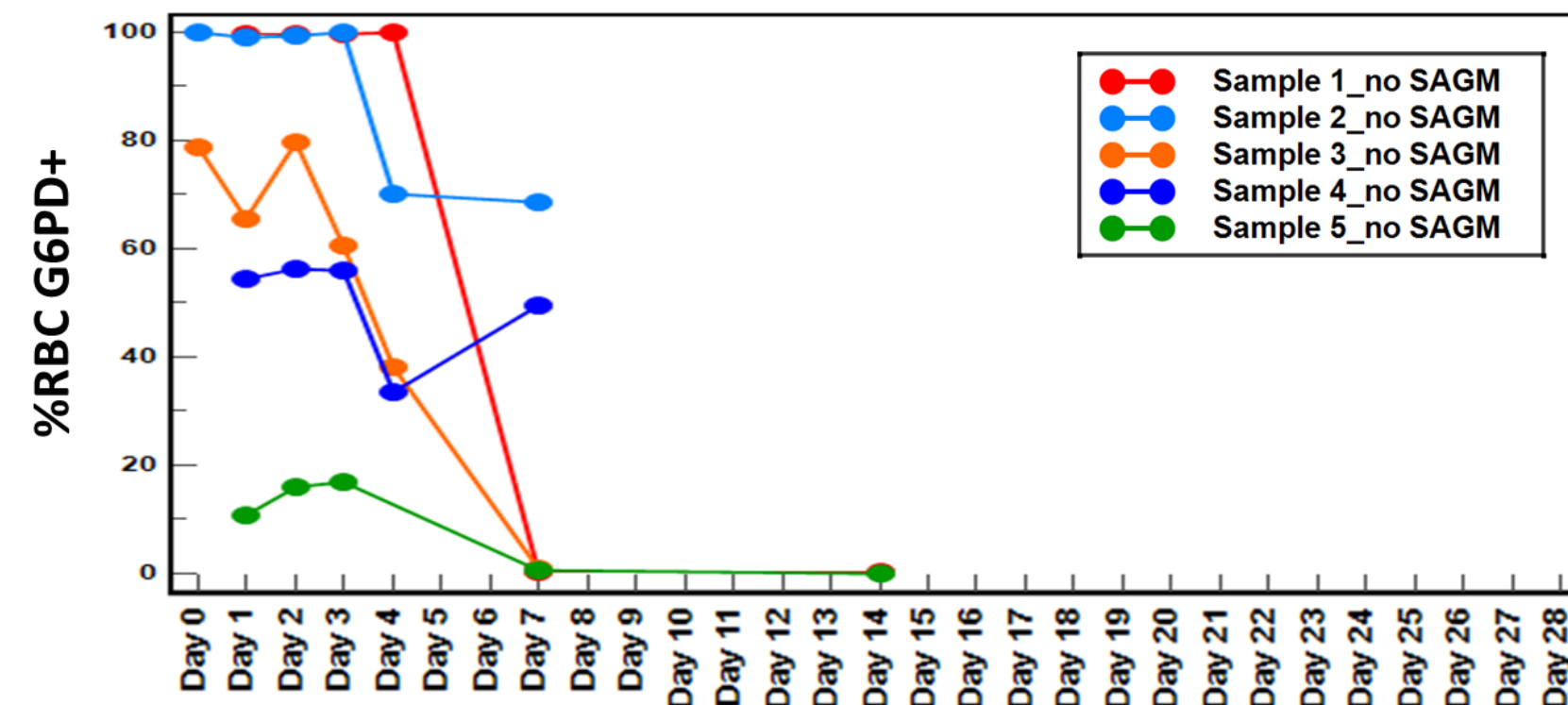
Echantillon : 100 μ L de sang ACD / EDTA

Analyse de cellules vivantes

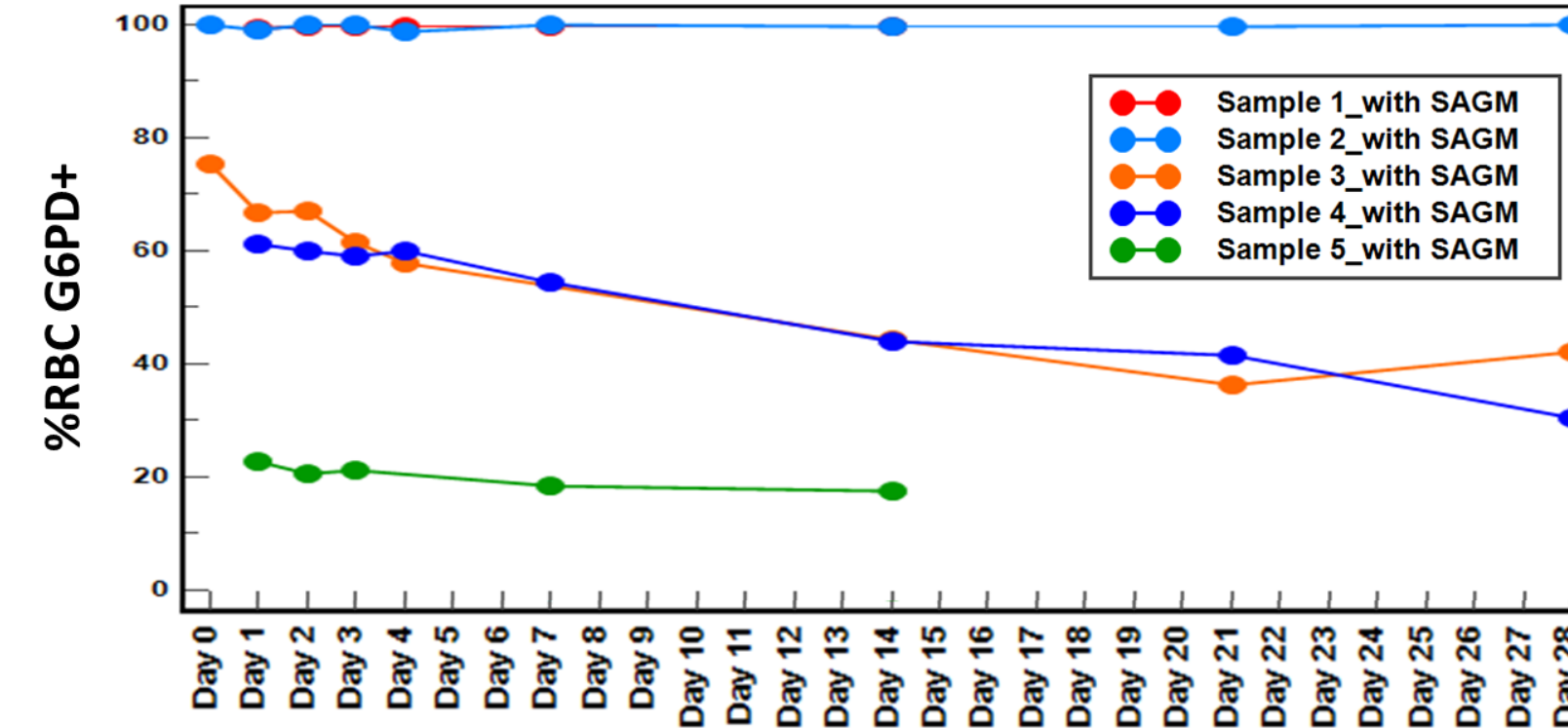
- Analyse à faire dans les 3 jours
- Jusqu'à J28 après ajout de SAGM



Sans SAGM



Avec SAGM

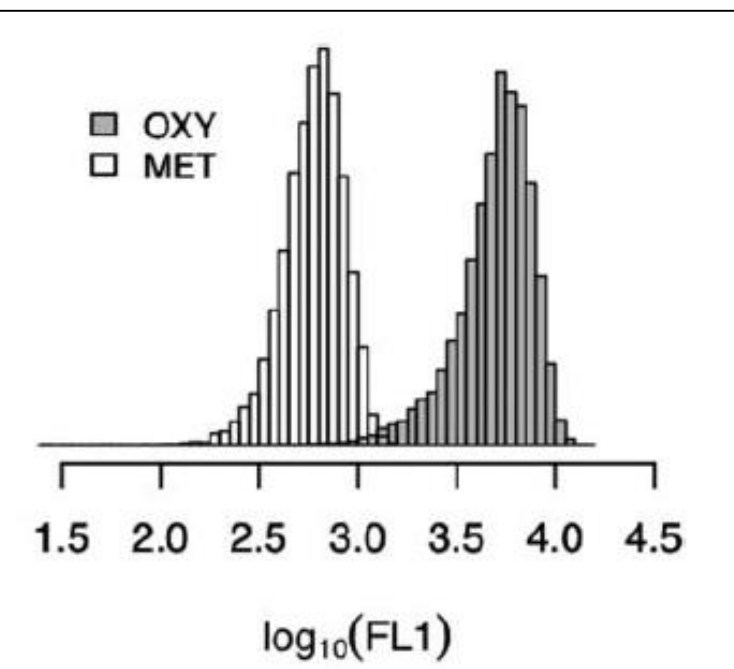


G6PD par CMF - Littérature

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. Wellems¹ & Rick M. Fairhurst¹

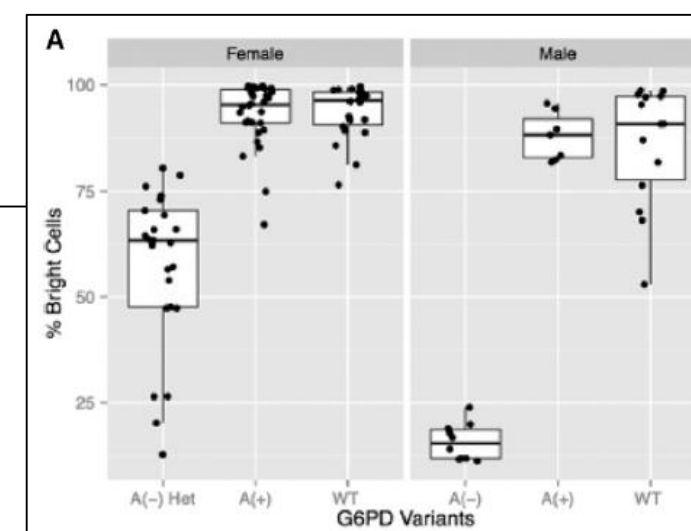


Larue et al. 2014 Journal of tropical medicine

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

Nicole LaRue, Maria Kahn, Marjorie Murray, Brandon T. Leader, Pooja Bansil, Sarah McGray, 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

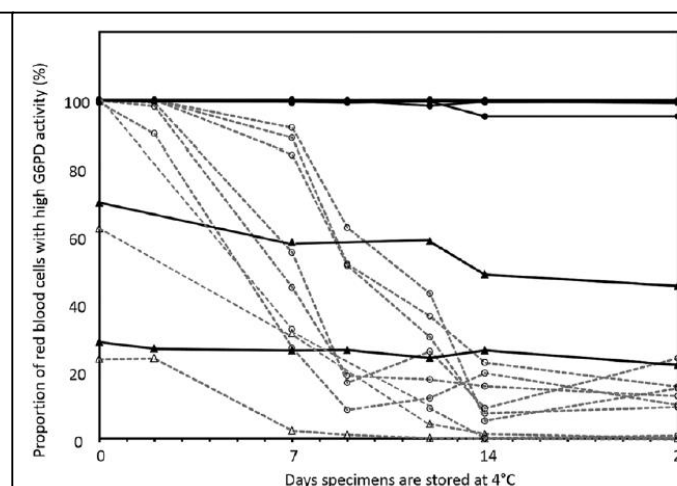


Kahn et al. 2015 Journal of Histochemistry & Cytochemistry

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**

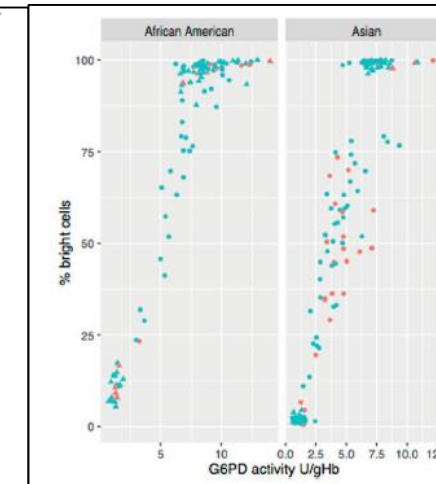
PATH, Seattle, Washington (MK, NL, MK, SP, GJD); and Walter Ward Consultancy & Training, New Mills High Peak, United Kingdom (WHJW)



Bancone et al. 2017 Scientific Reports

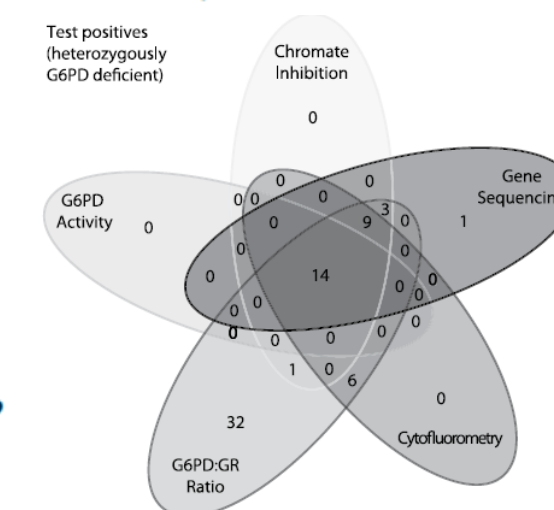
The G6PD flow-cytometric assay is a reliable tool for diagnosis of G6PD deficiency in women and anaemic subjects


Germana Bancone^{1,4,5}, Michael Kalnoky², Cindy S. Chu^{1,4,5}, Nongnud Chowwiwat¹, Maria Kahn², Benoit Malleret^{1,3,4}, Pornpimon Wilaisrisak¹, 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 Korte , Cornelis J.F. Van Noorden,* and Rob van Zwieten

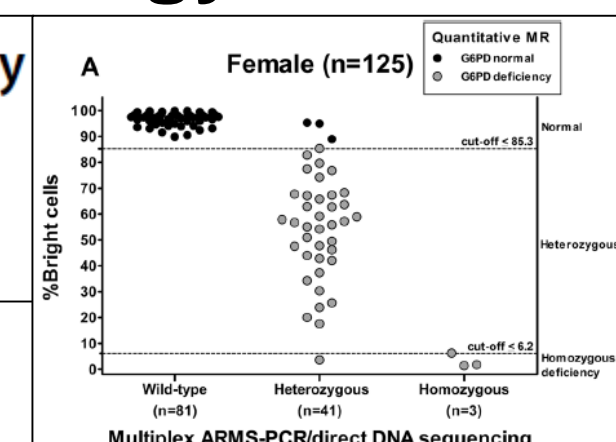
Kapadia et al. 2021 Tropical Medicine and International Health

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

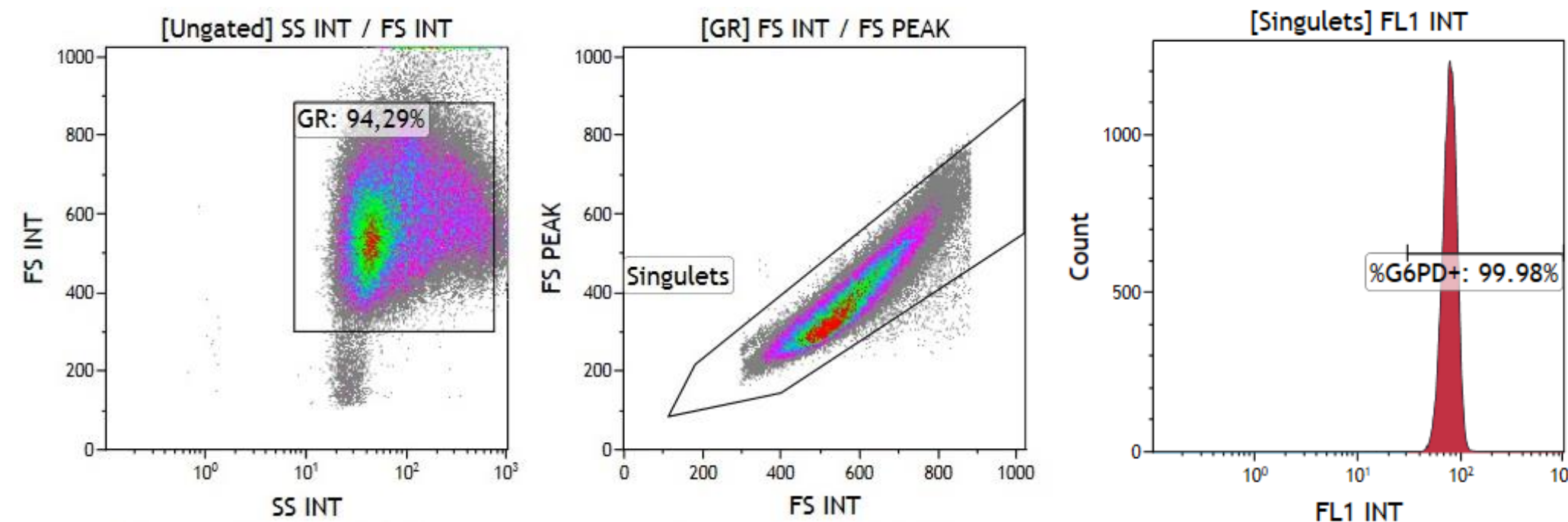
Anchalee Thedsawad¹ · Wanchai Wanachiwanawin¹ · Orathai Taka¹ · Chattree Hantaweeant¹

G6PD par CMF – Expérience rouennaise

514 patients entre octobre 2022 et décembre 2023

➤ **Spectro + CMF**

2 cytomètres Navios EX (Beckman-Coulter)

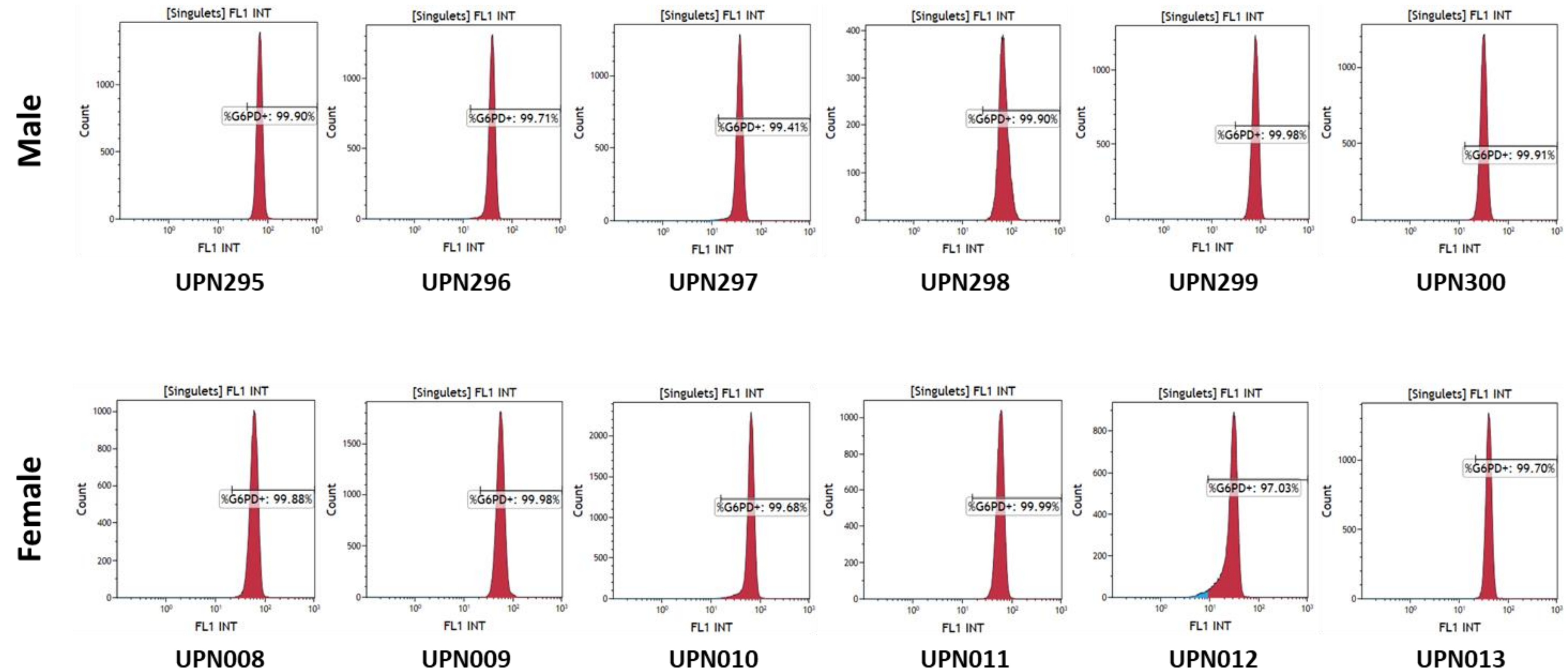


Analyse de **50 000 GR** minimum
Fluorescence recueillie en **FL1** (canal **FITC**)

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

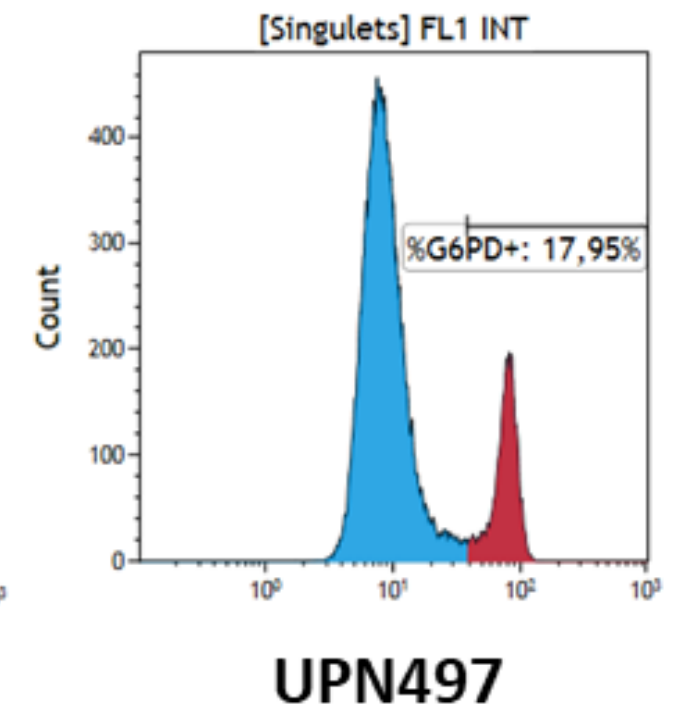
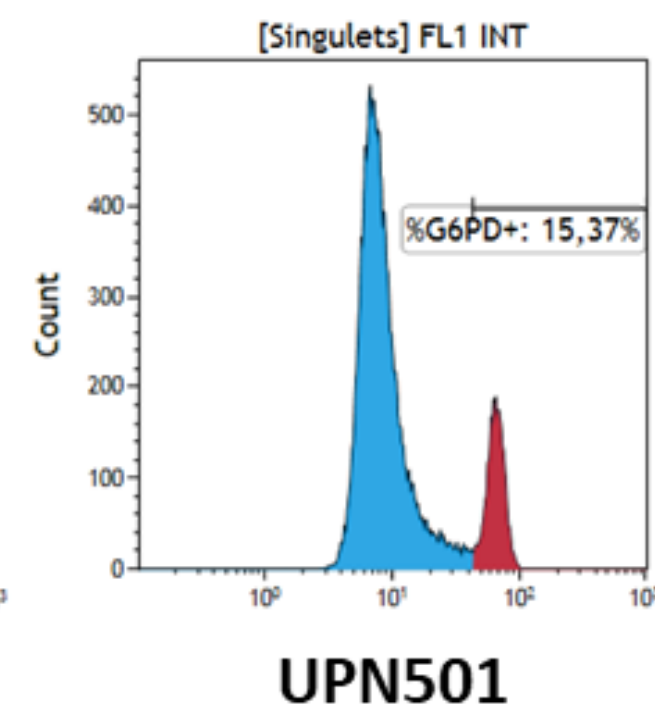
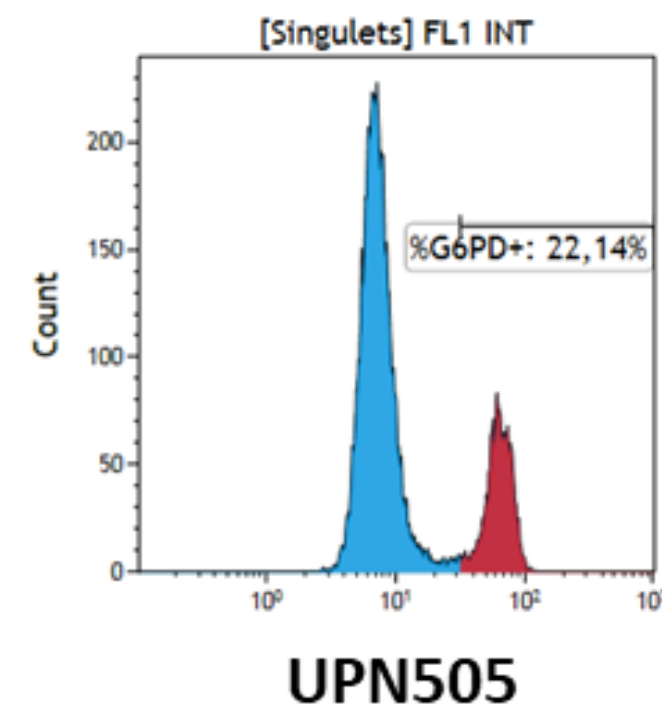
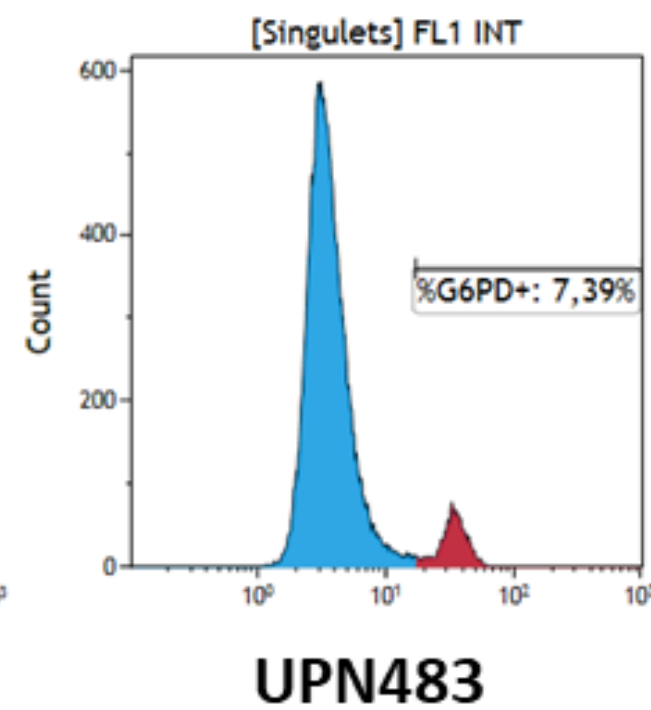
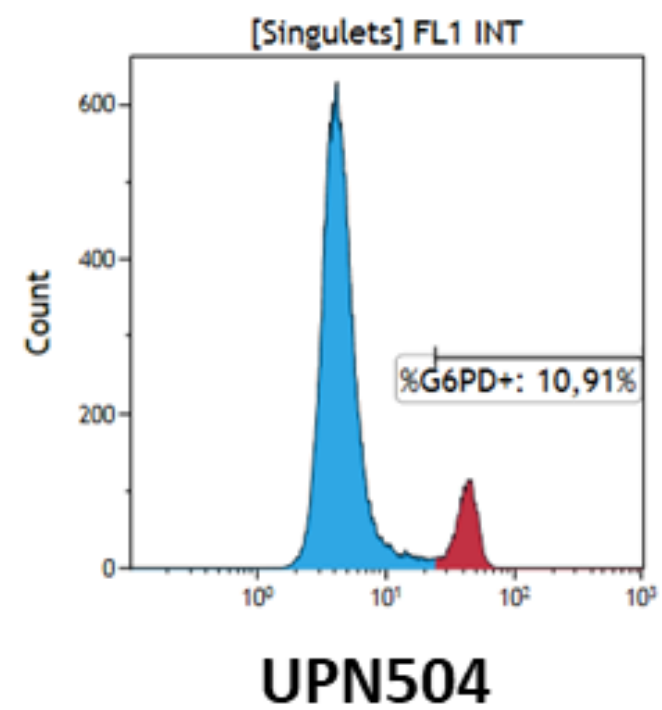
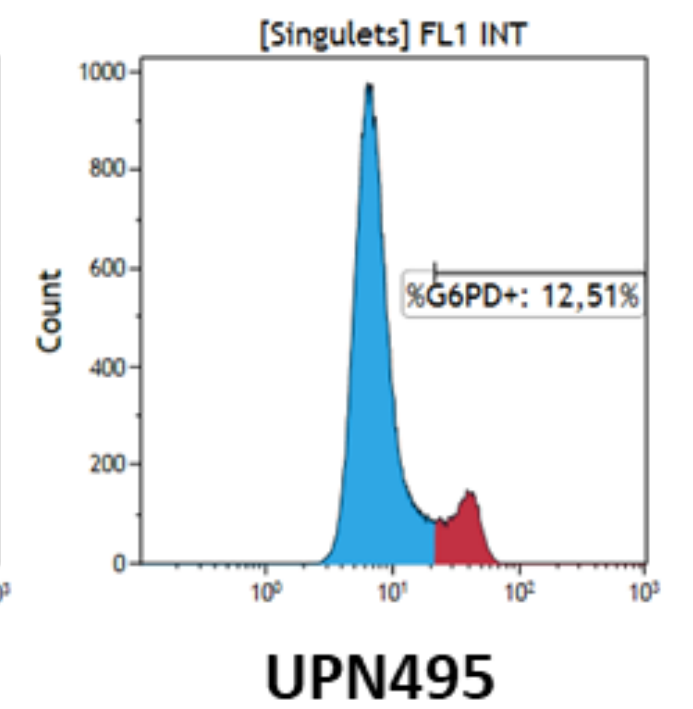
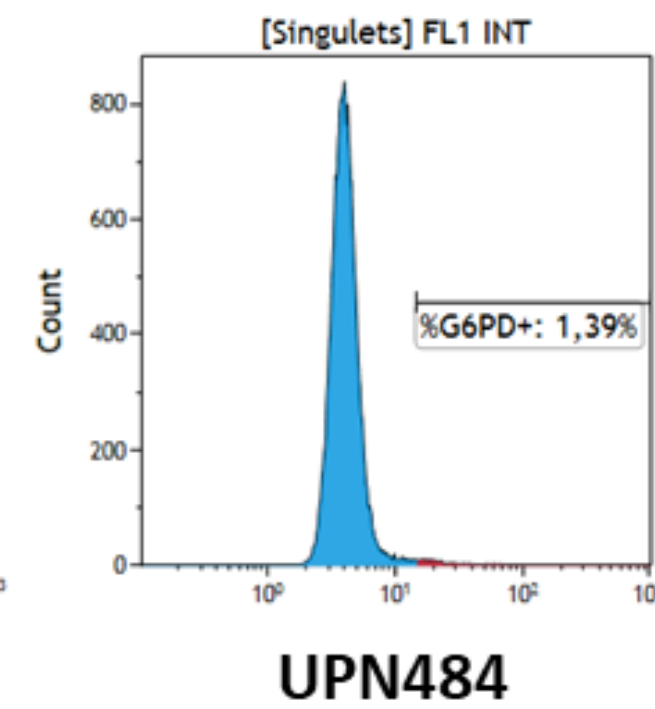
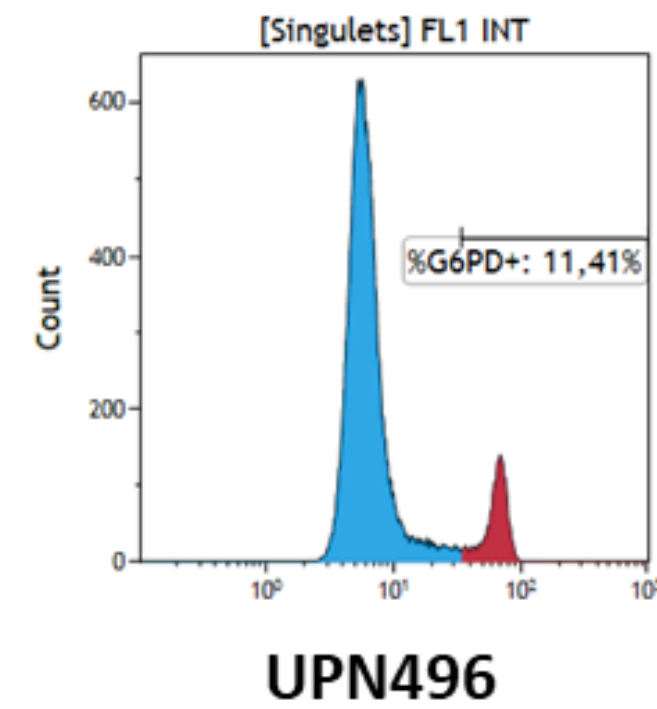
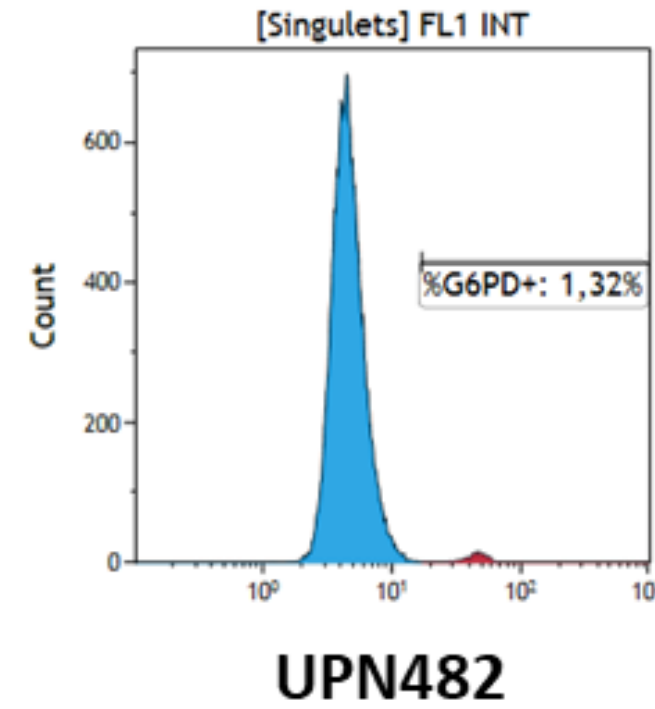
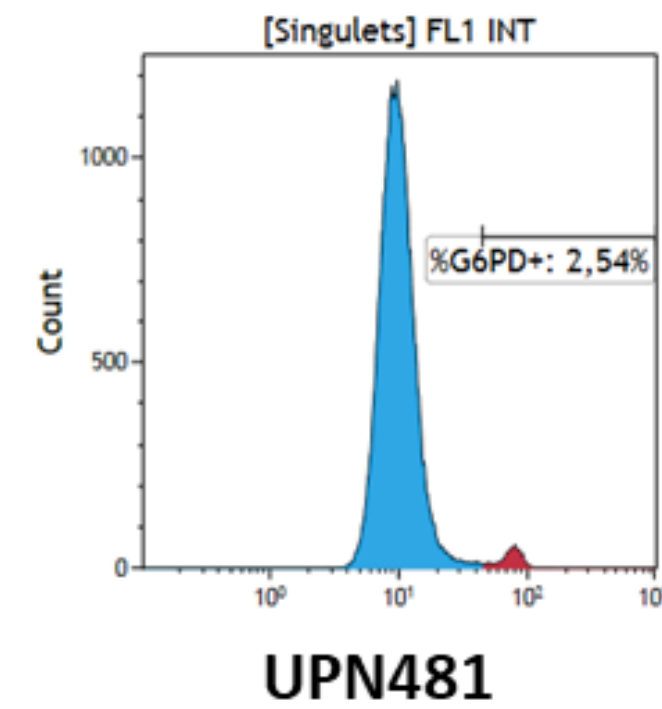
G6PD par CMF – Expérience rouennaise

- Résultats normaux



G6PD par CMF – Expérience rouennaise

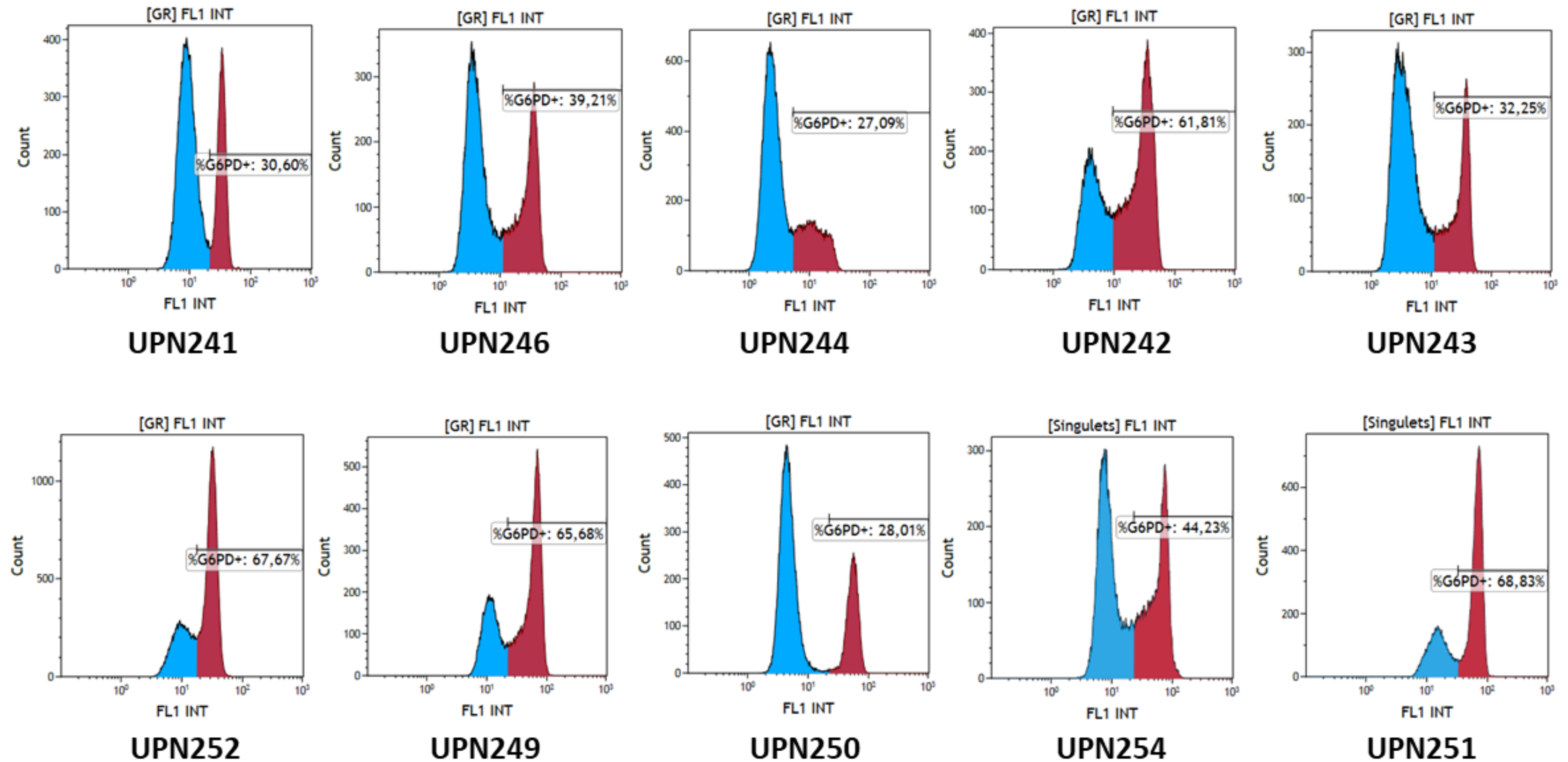
- Hémizygotes



Contingent de 5-20% de GR G6PD+

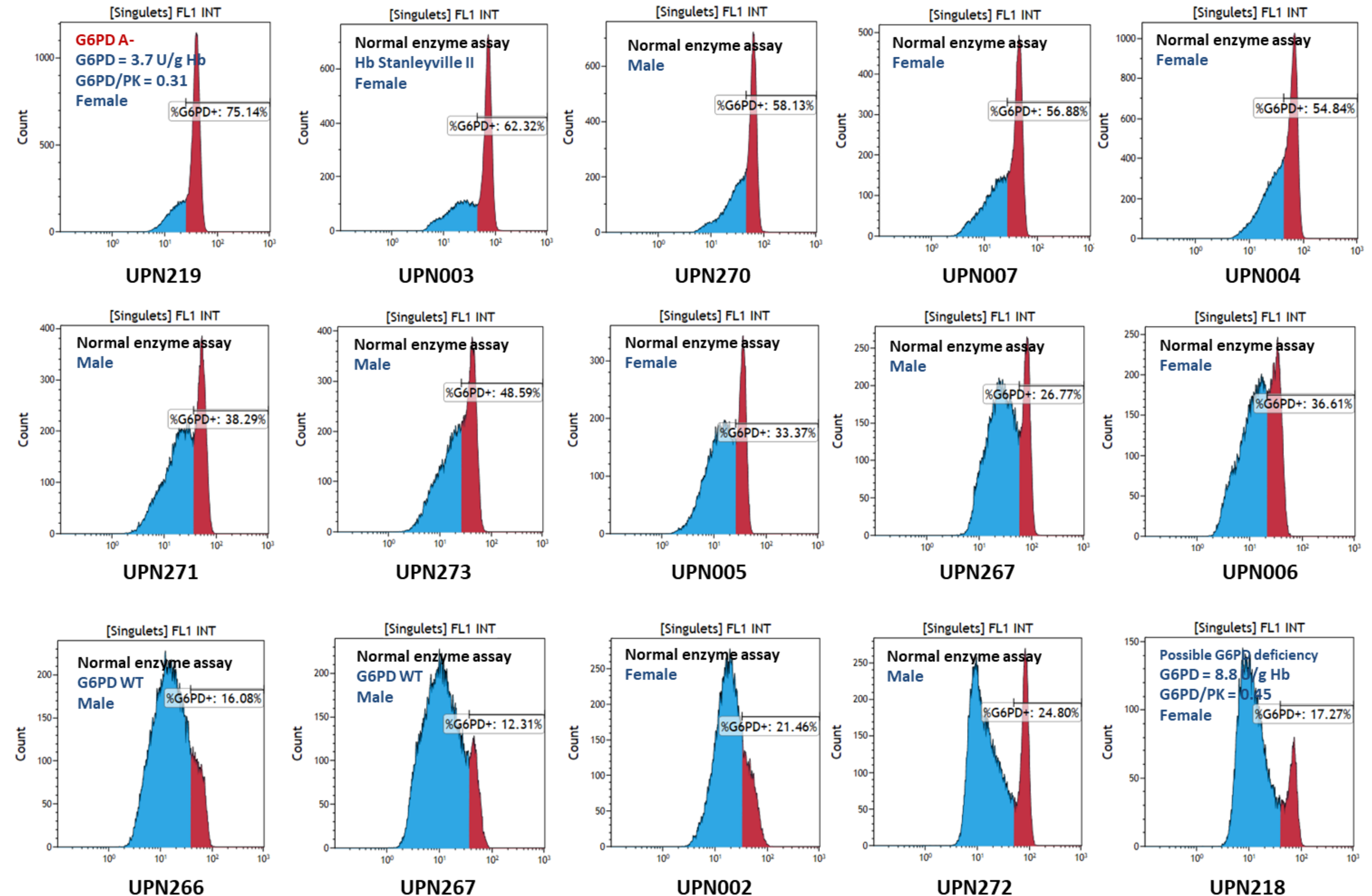
G6PD par CMF – Expérience rouennaise

- Hétérozygotes



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

G6PD par CMF – Expérience rouennaise



- Profils atypiques

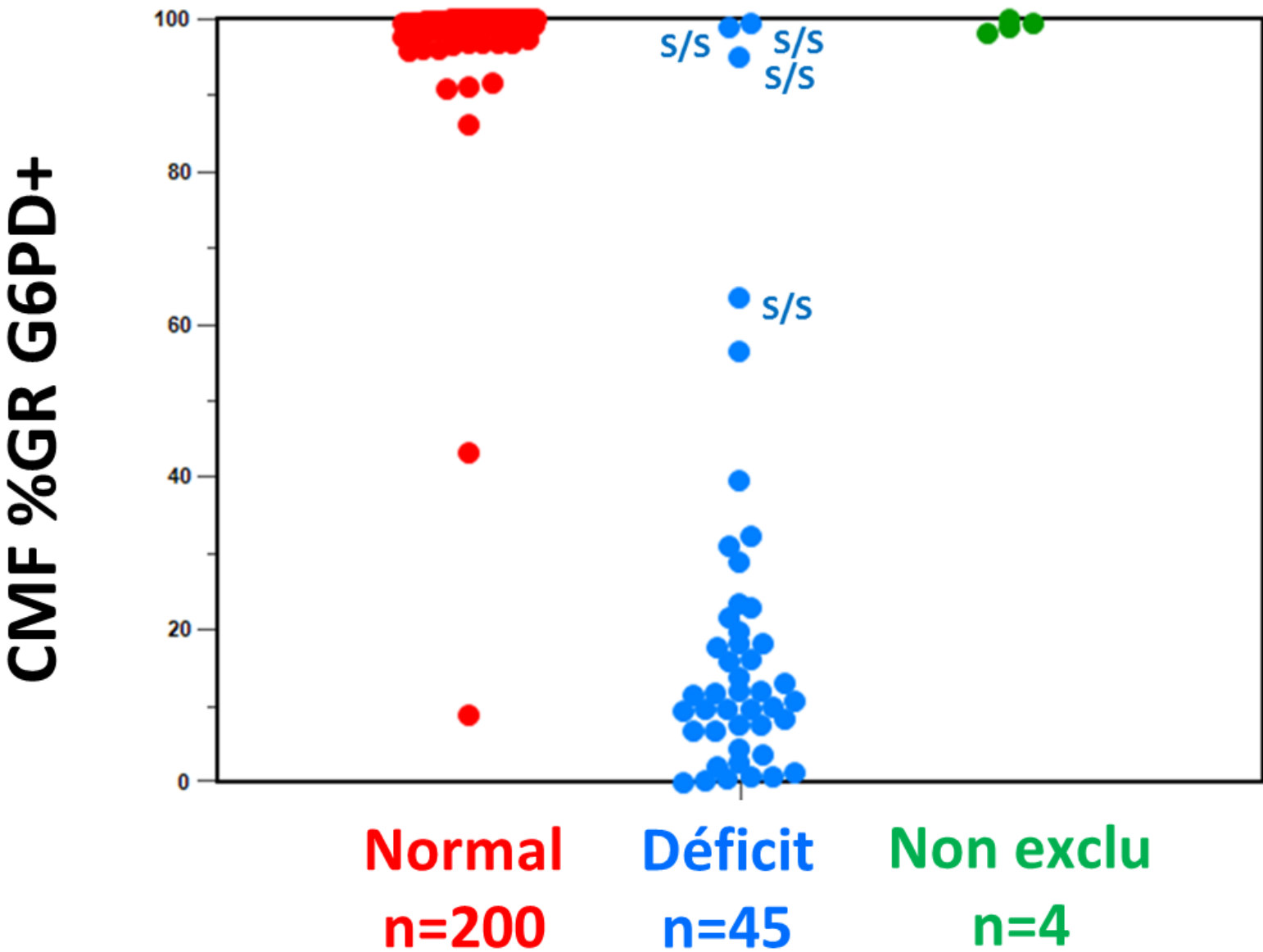
Environ 5% des cas

Ininterprétable

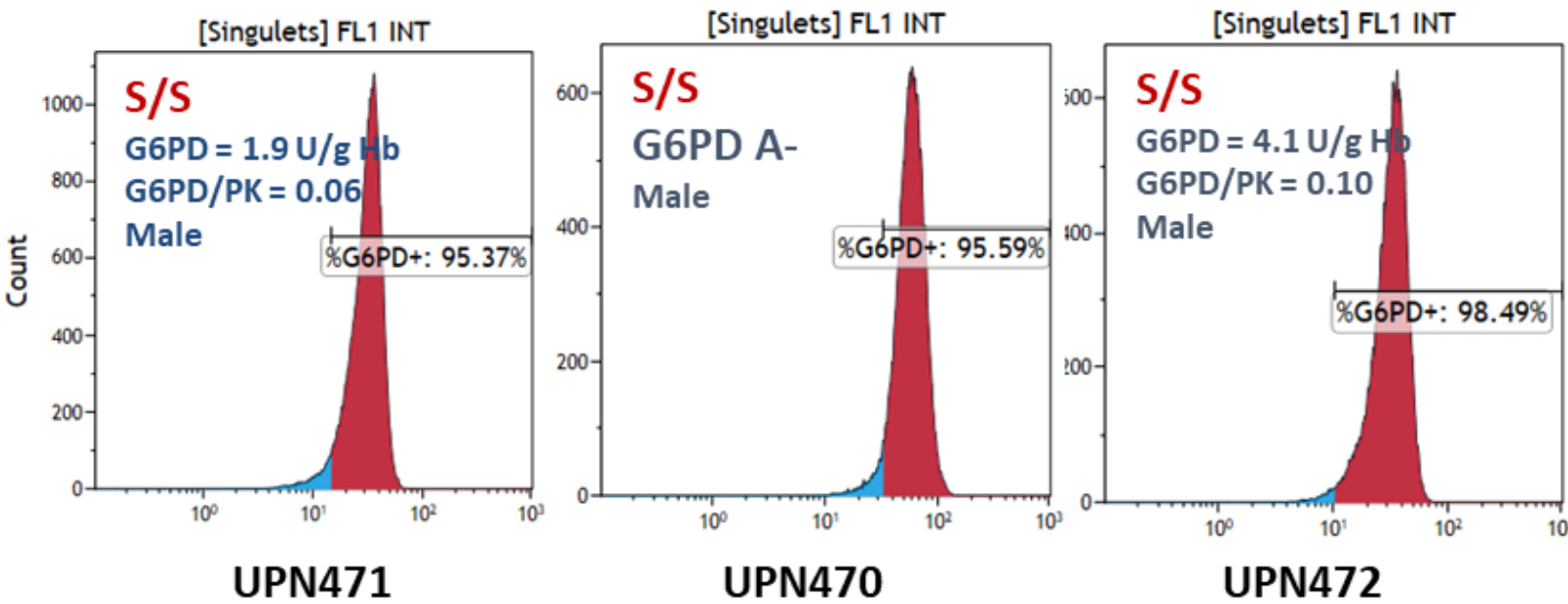
Performances du test par CMF

Hommes

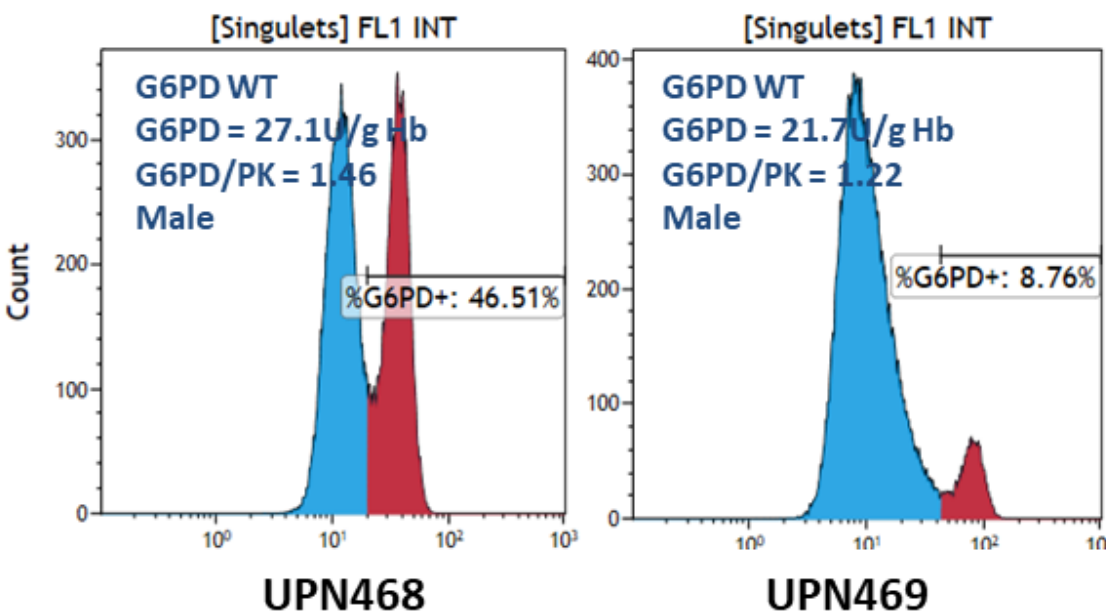
Moyenne GR G6PD+ = 9,8%



Faux négatifs



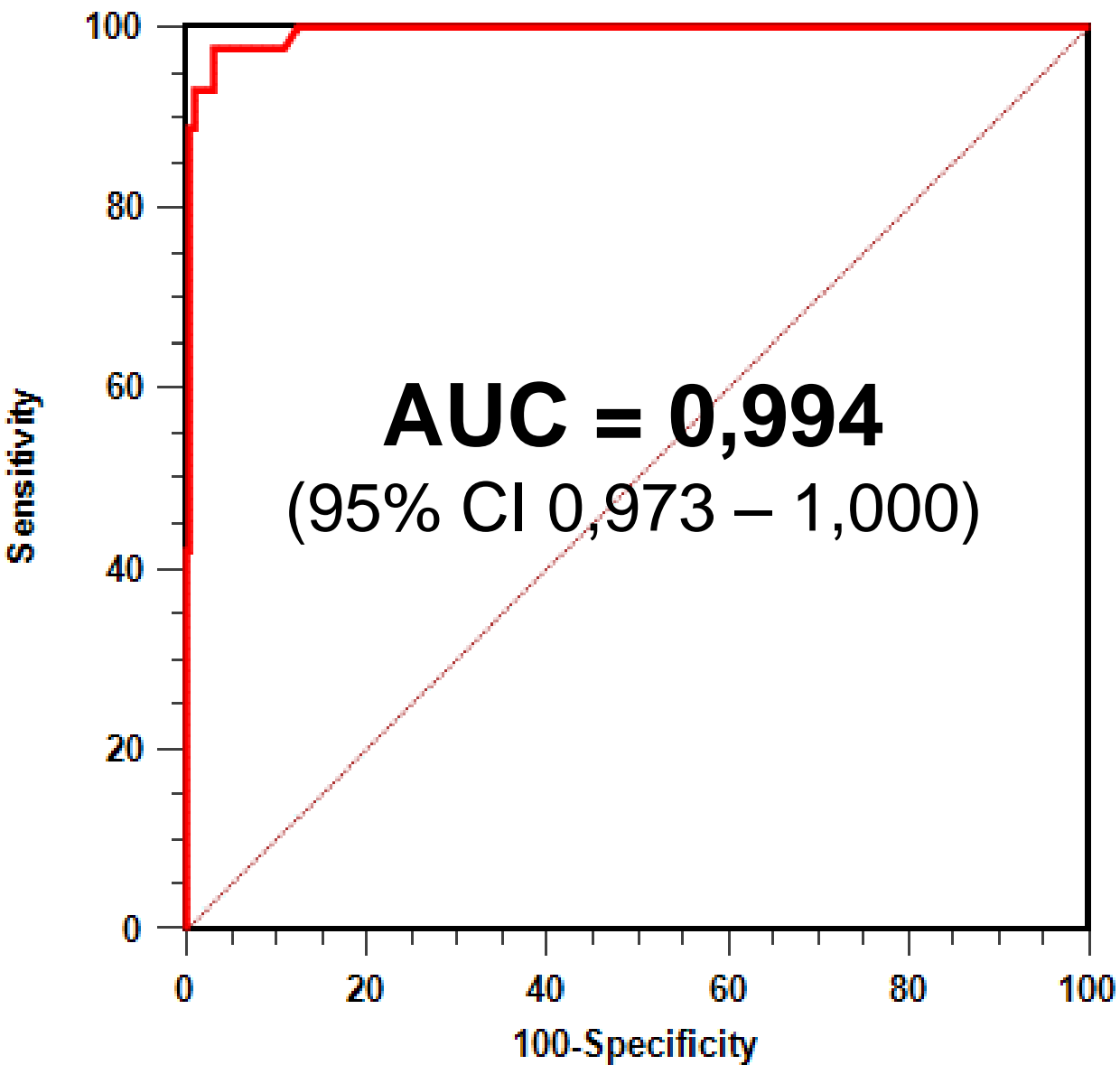
Faux positifs



Indice Kappa = 0,93		Diagnostic Final		
		Hommes (n=249)		
		Déficit	Normal	Non exclu
CMF	Déficit	42	2	0
	Normal	3	190	4
	Profil atypique	0	8	0

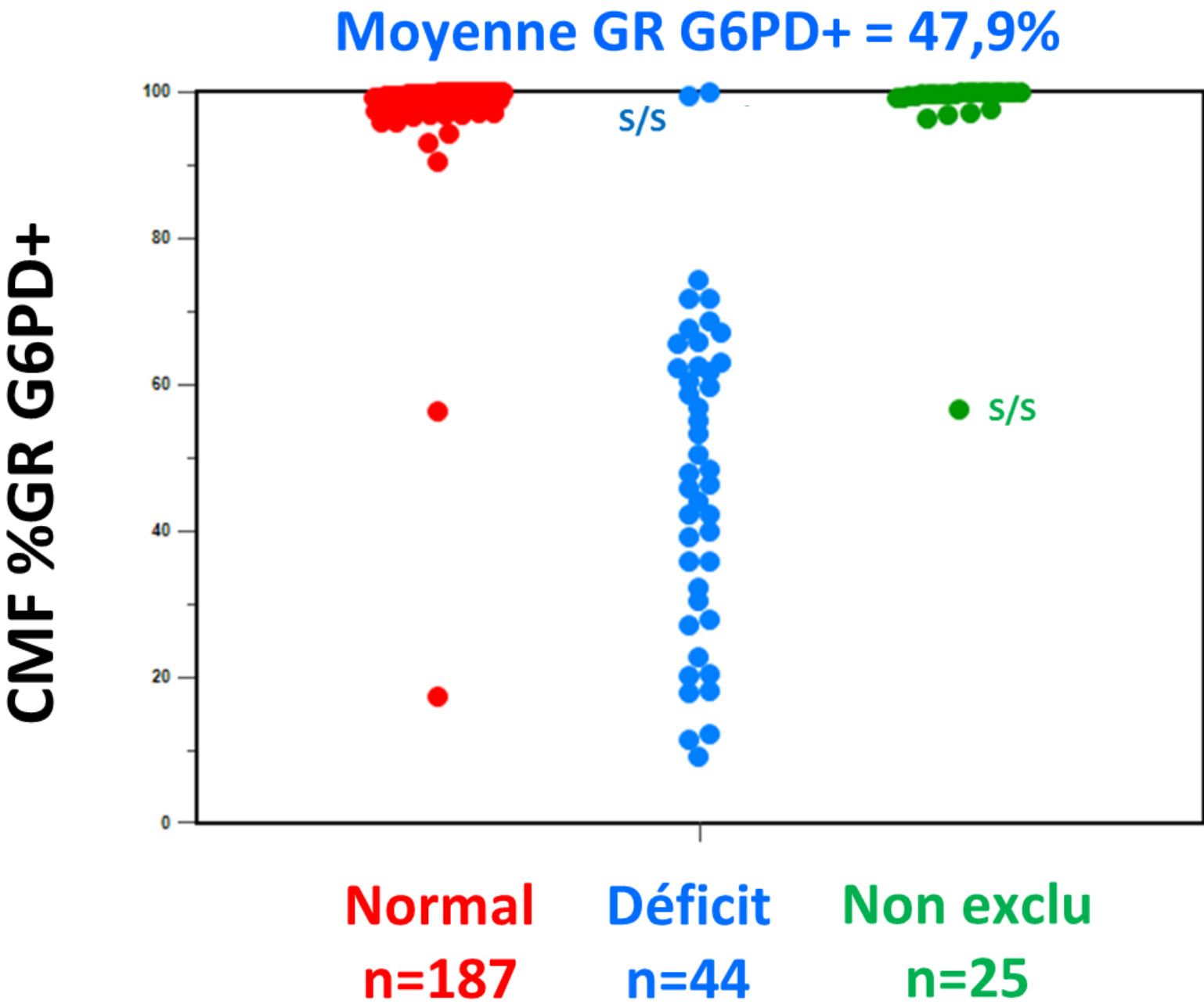
Se = 93,3%
Sp = 99,0%

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

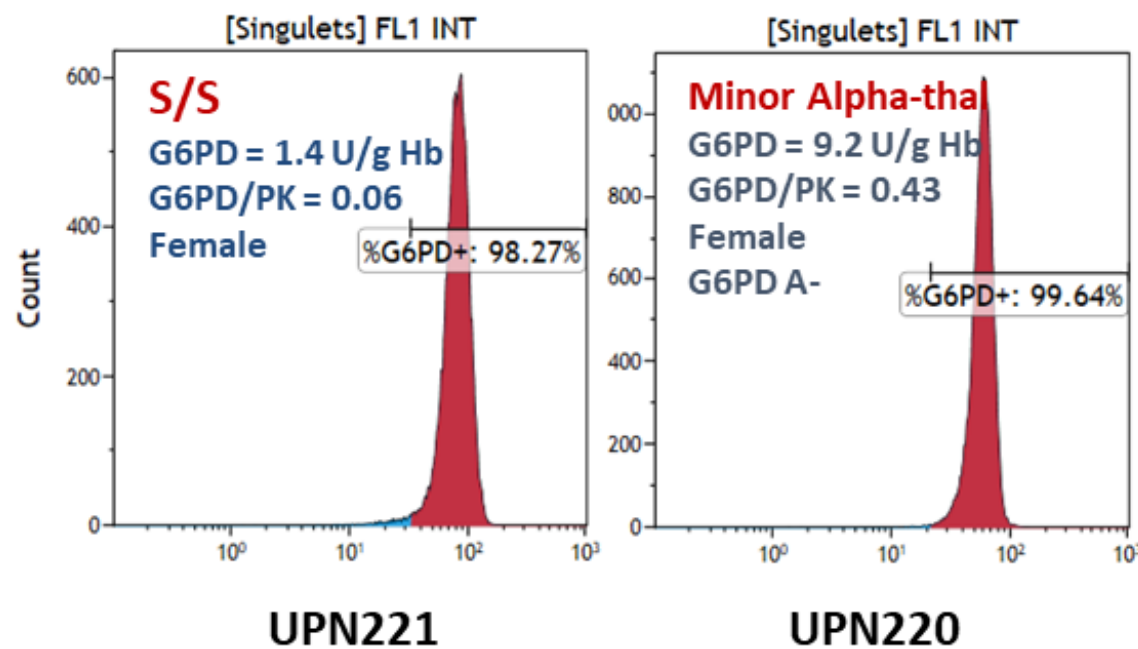


Performances du test par CMF

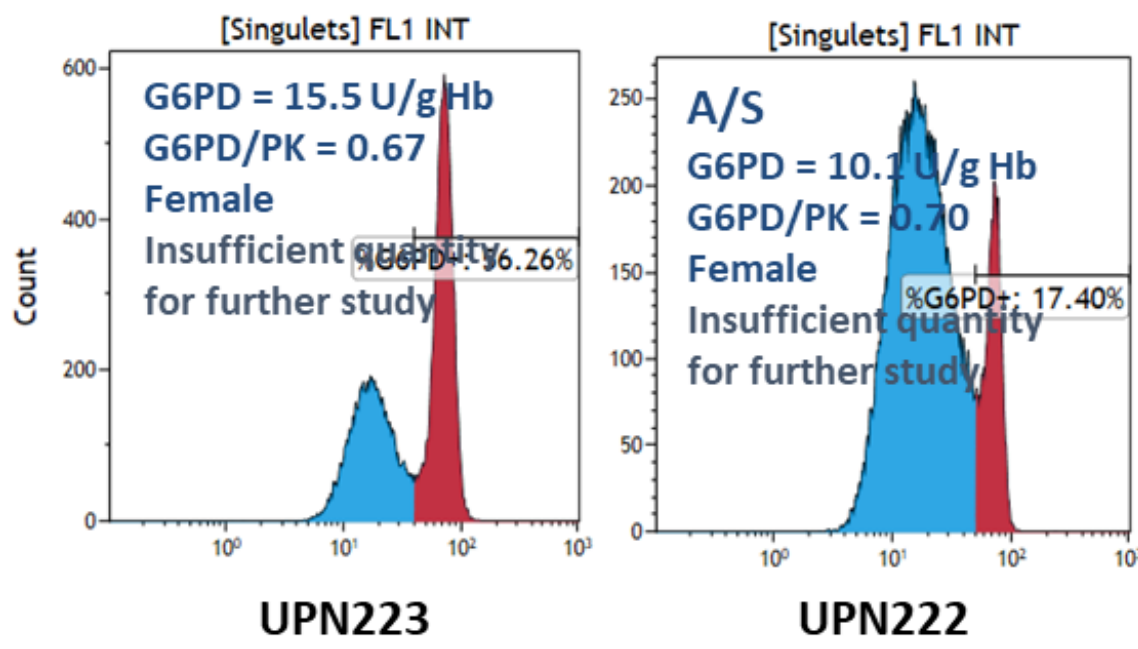
Femmes



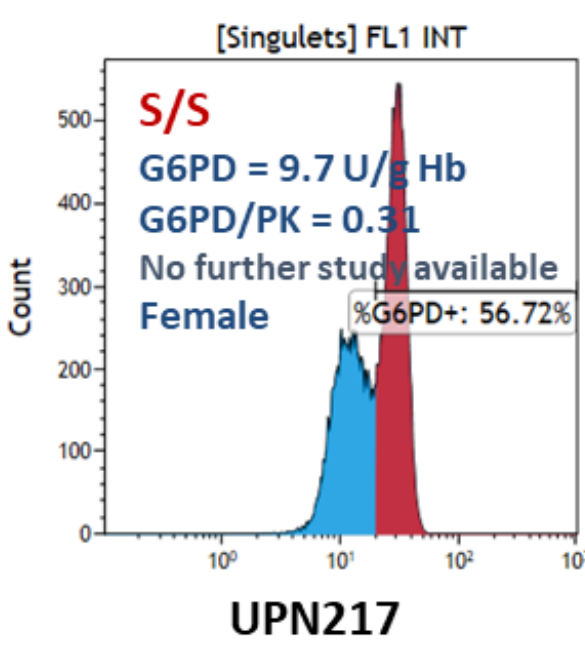
Faux négatifs



Faux positifs



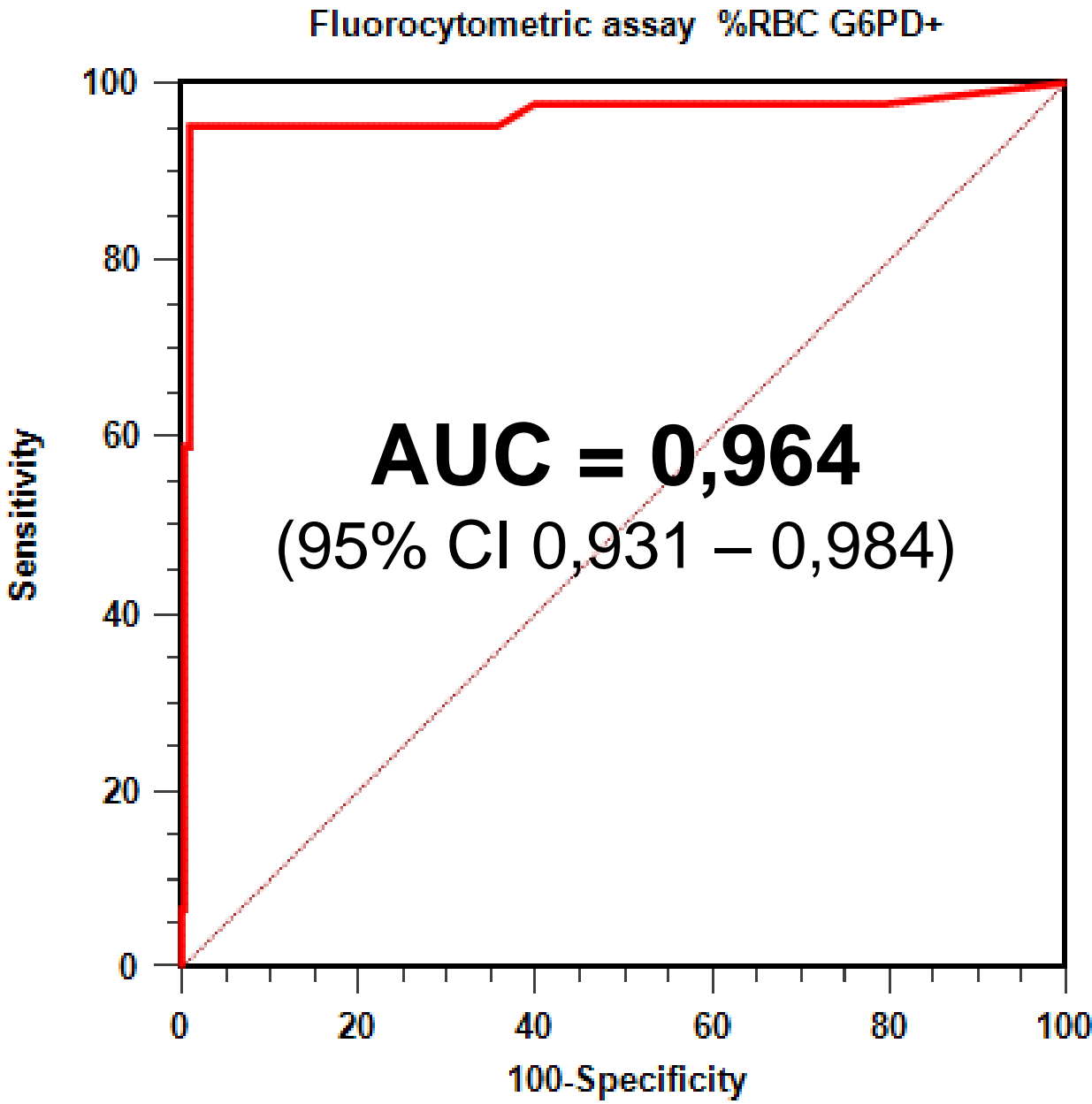
Indéterminé



Indice Kappa = 0,94		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%

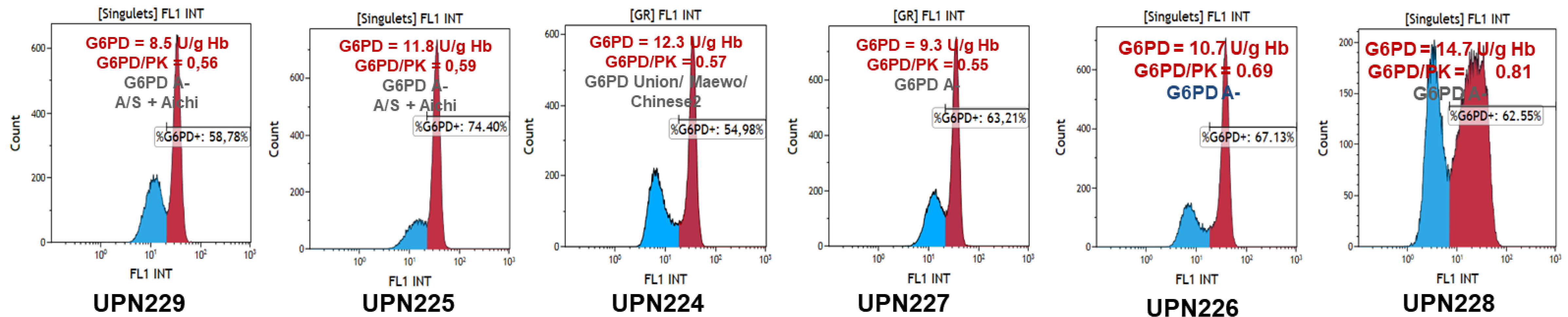
VPP = 95,5%
VPN = 98,9%



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

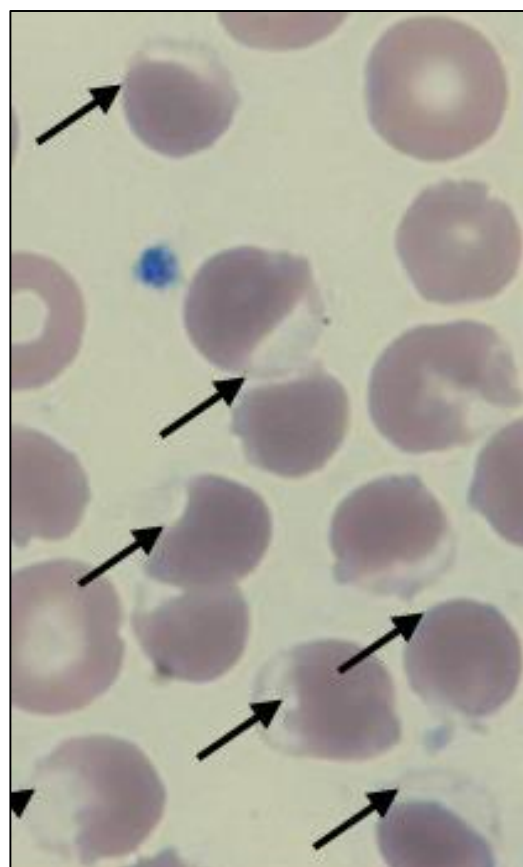
Résultats anormaux
+G6PD par CMF



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

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		Henri Mondor, Créteil
Techniciennes Globules Rouges	Biologistes Hématologie	Biochimie
Céline BOCQUET	Maïssa SOUISSI	Stéphane MOUTEREAU
Edwige BRARD	Elsa BERA	
Caroline CHATELLIER	Catherine BOUTET	Génétique
Cécile CONTE	Agnès LAHARY	Serge PISSARD
Emilie ROUSSEAU		


ORIGINAL ARTICLE

Accepted: 10 September 2024

CLINICAL CYTOMETRY

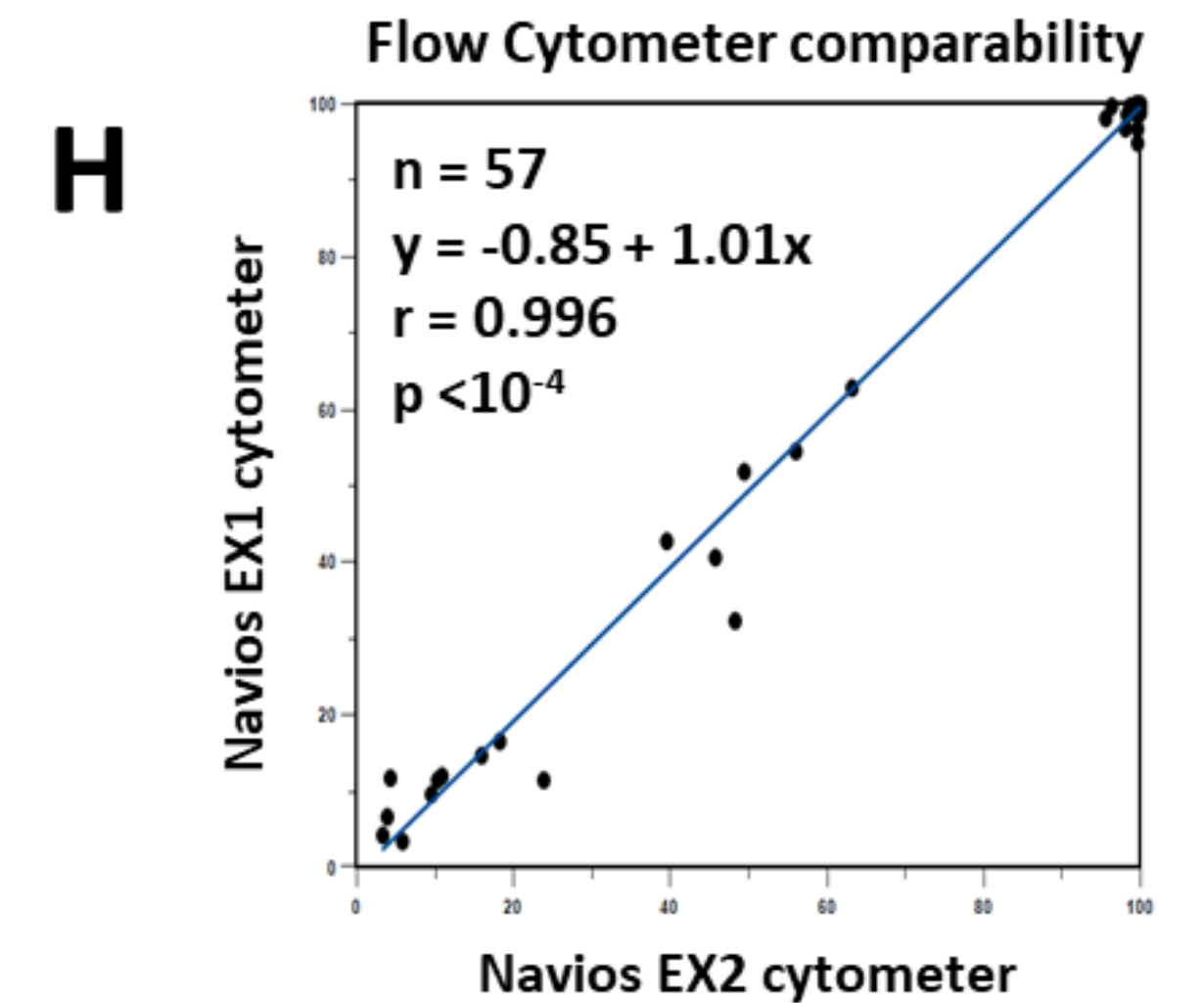
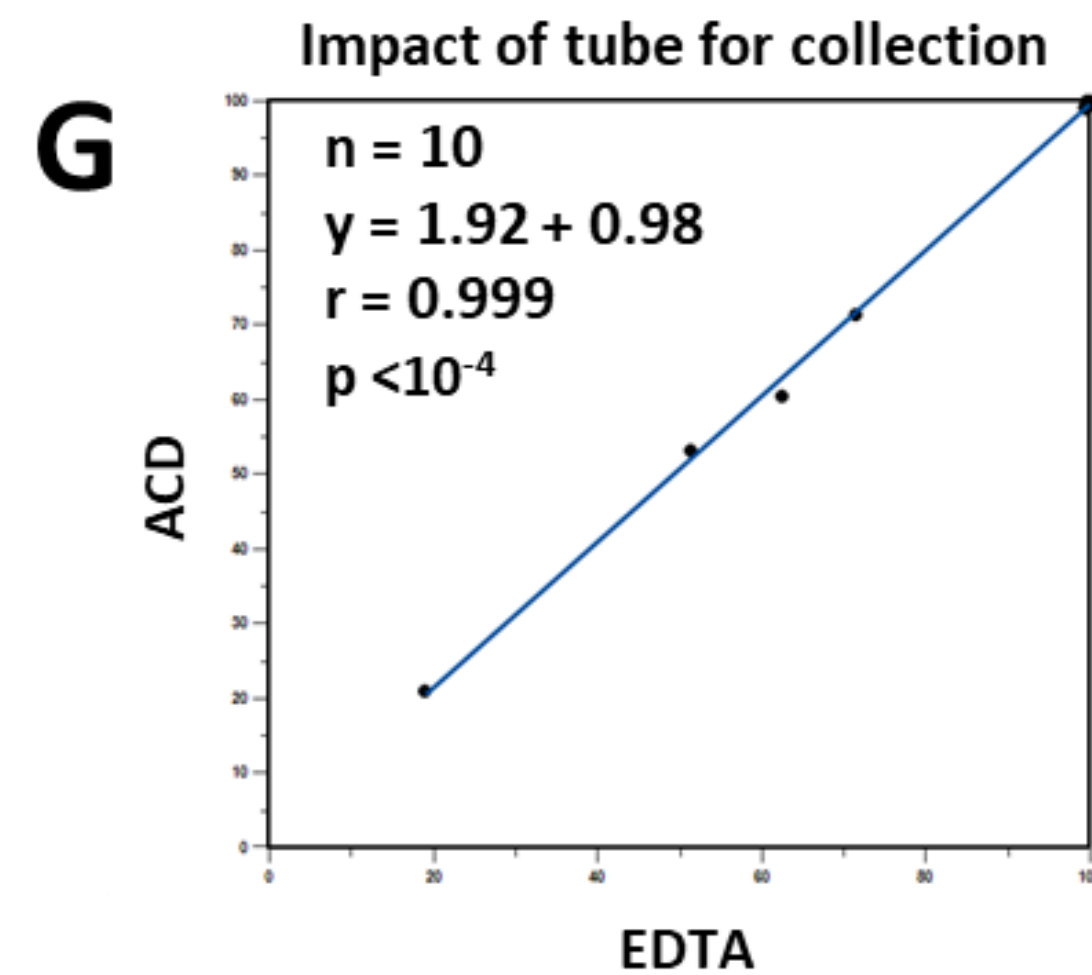
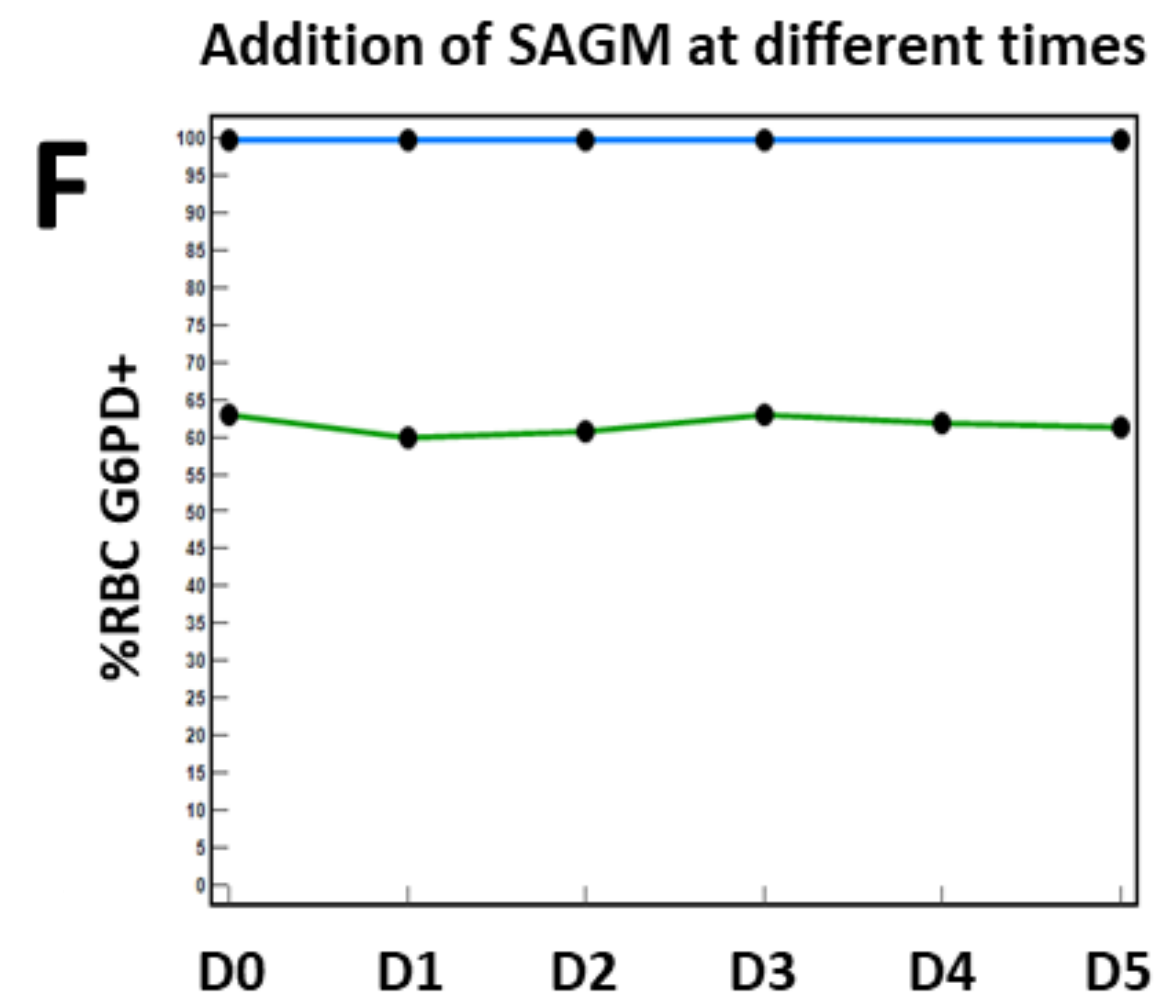
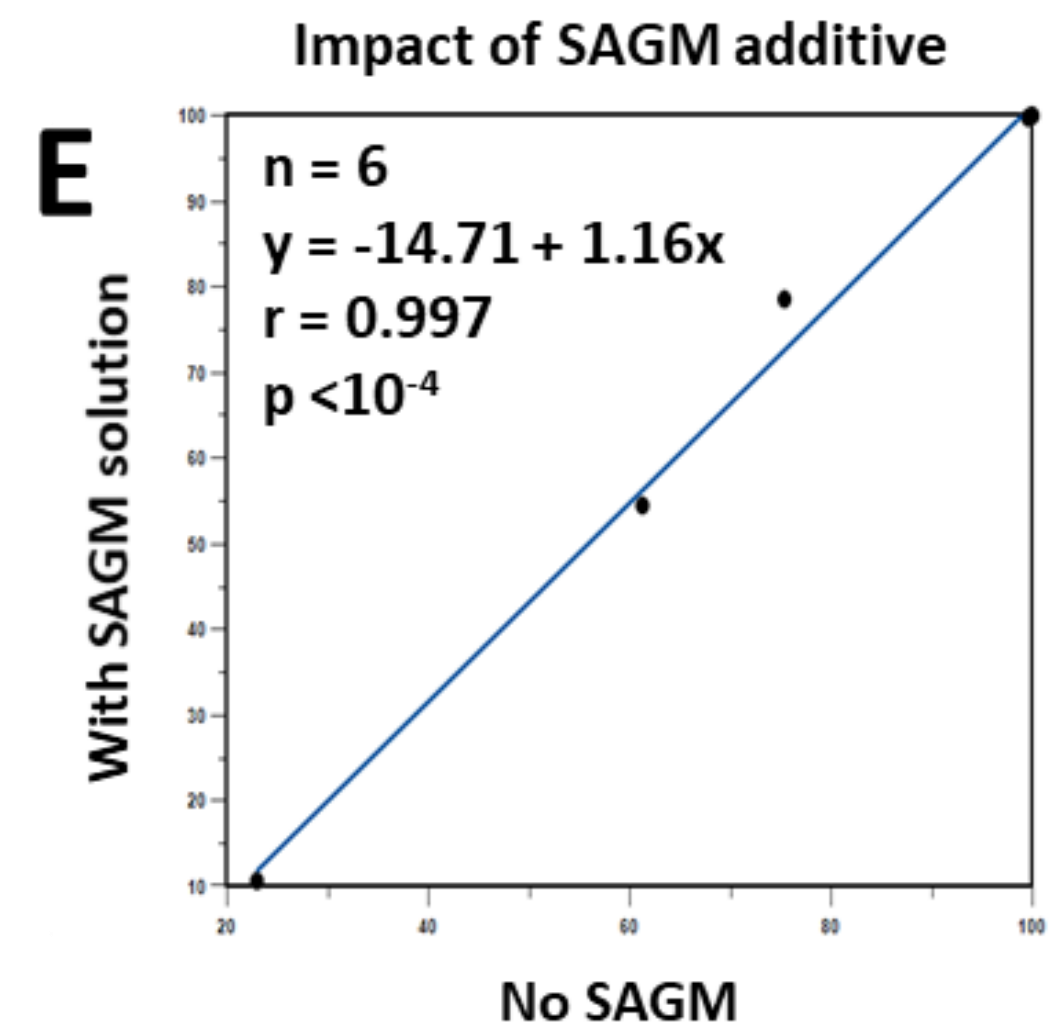
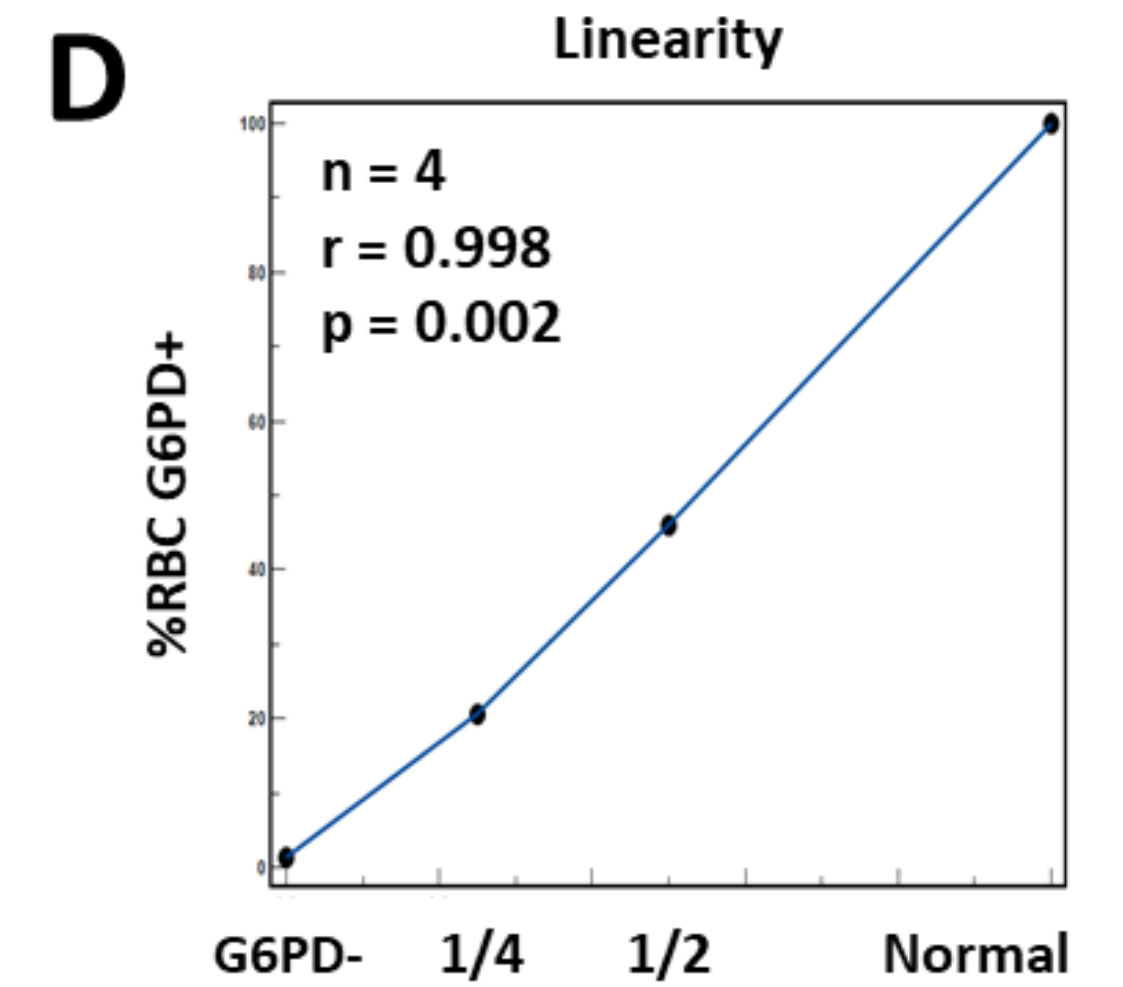
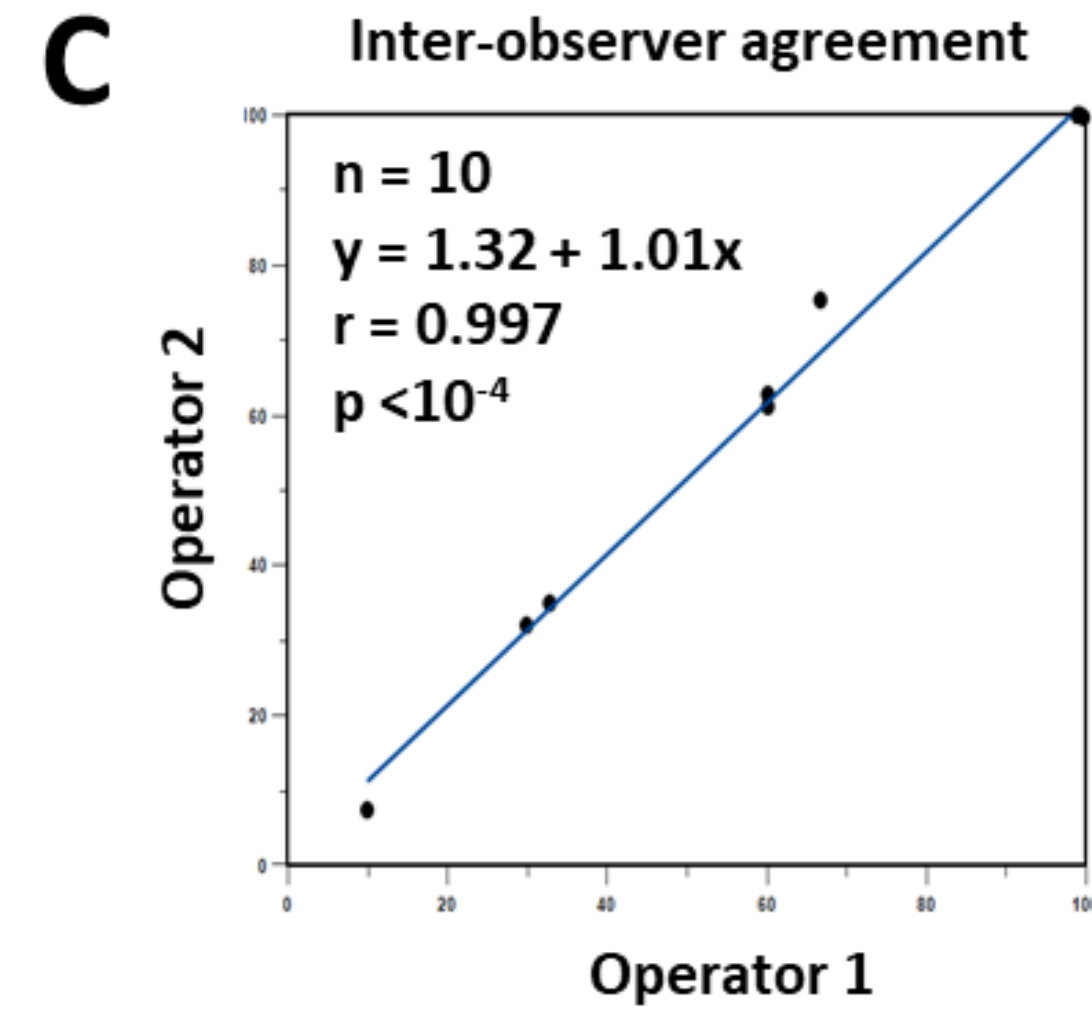
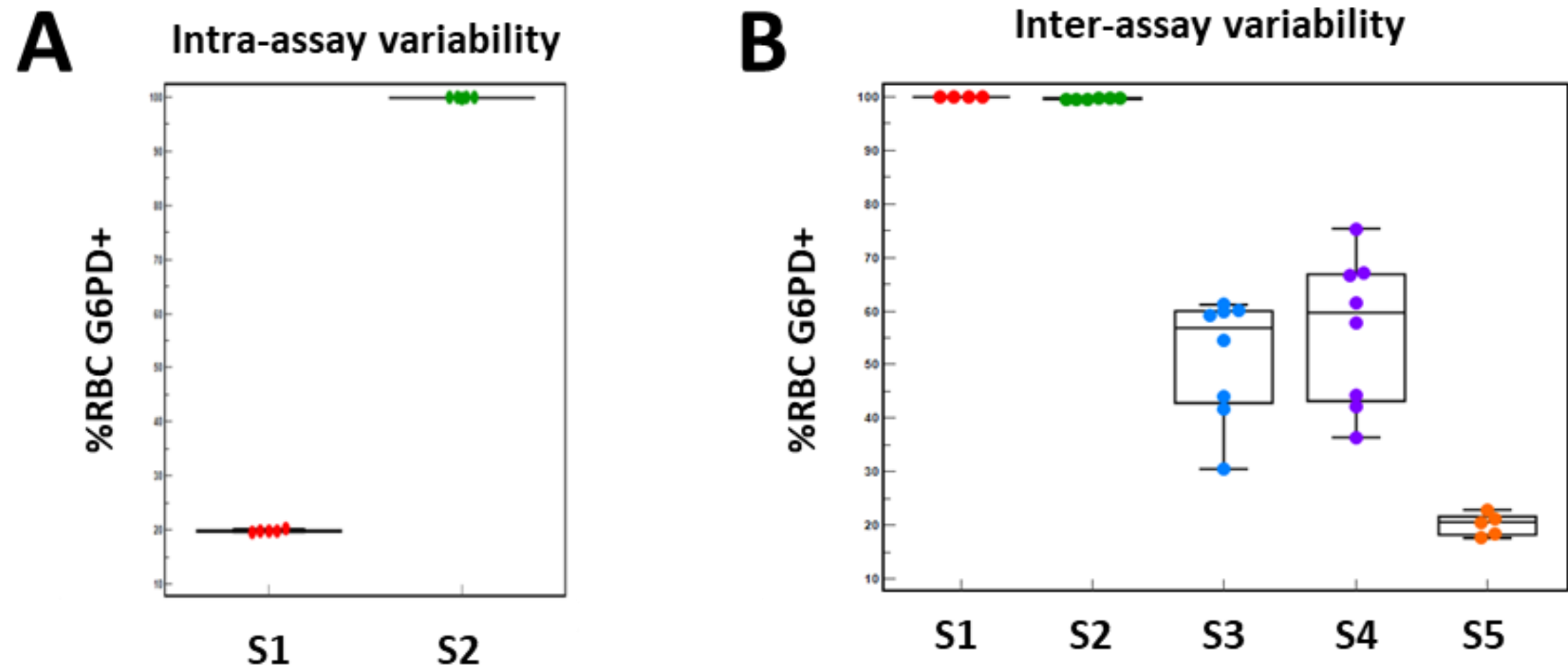
WILEY

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

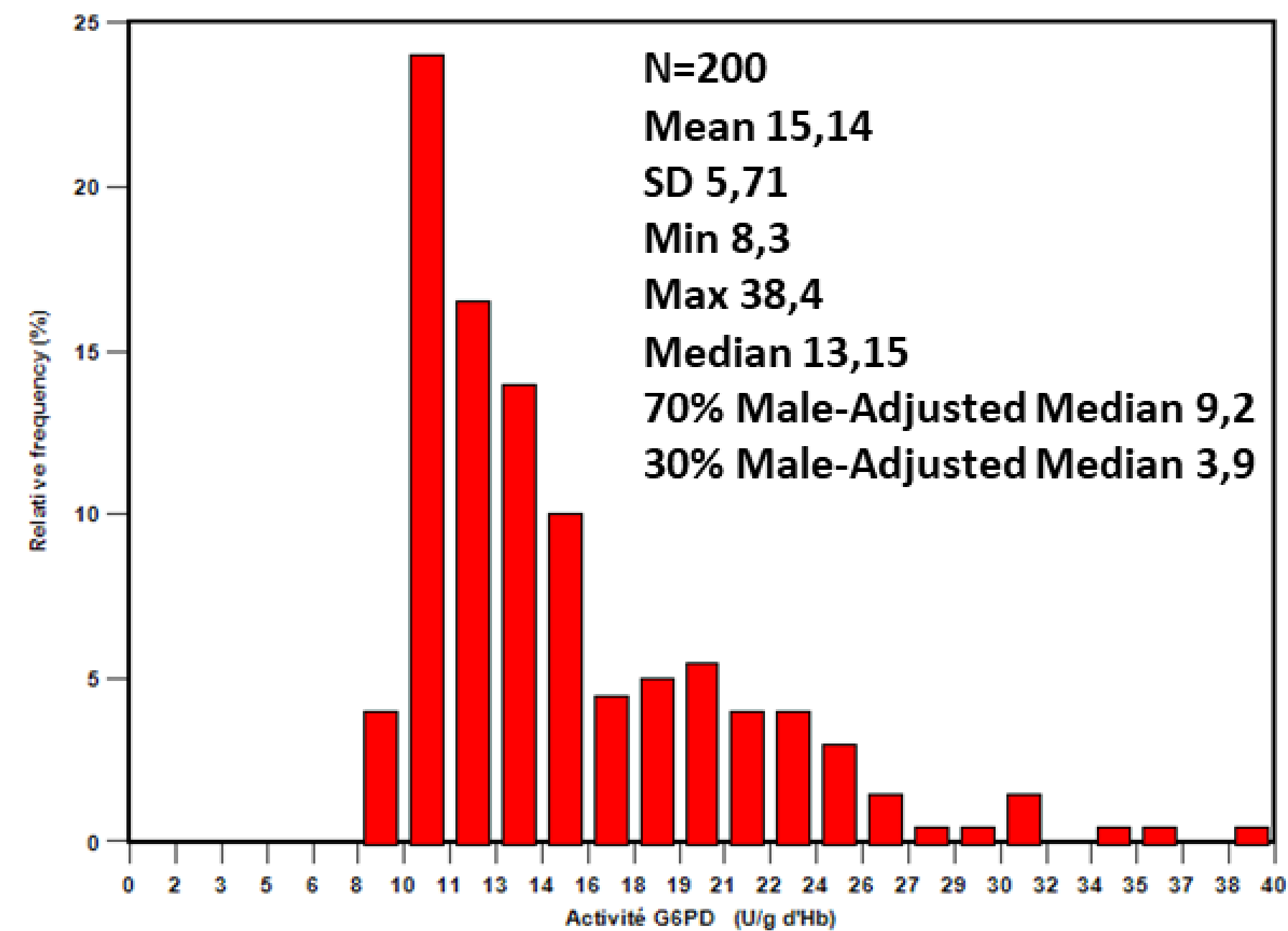
Validation de Méthode – G6PD par CMF



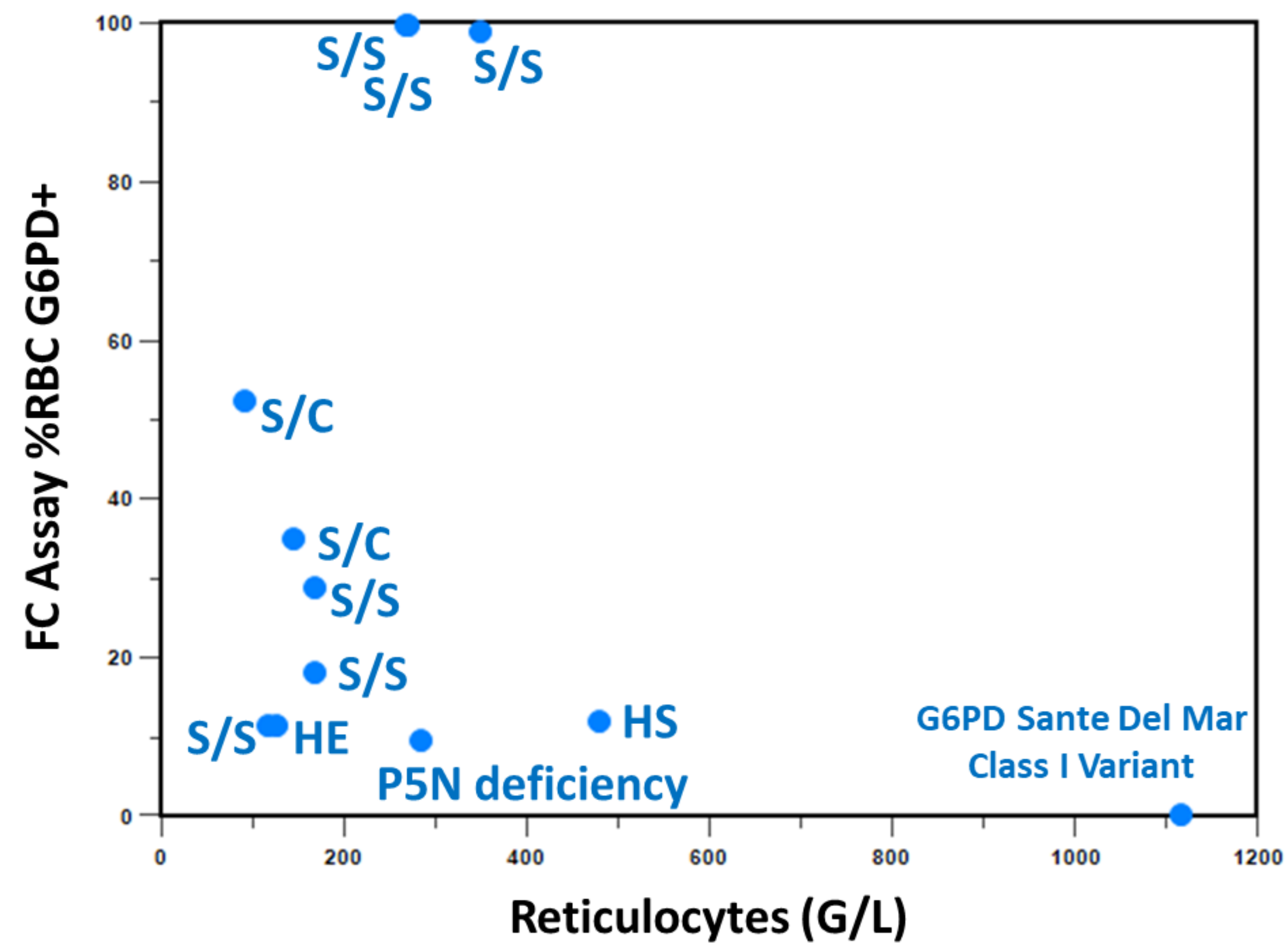
Répartition des activités

Médiane chez les hommes sans déficit

Male with no deficiency



Patients avec hémolyse chronique



Impact de l'âge sur l'inactivation du X

