

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE: 2018

THESE 2018 TOU3 2079

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE
MEDICALE**

Tenant lieu de Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

Lucie DECOEUR

Le 19 octobre 2018, à Bordeaux

**Mise en place d'une nouvelle méthode de dosage de
l'activité enzymatique érythrocytaire de la glucose-6-
phosphate déshydrogénase (G6PD)**

Directeur de Thèse : Madame le Docteur Stéphanie DULUCQ

JURY

Madame le Professeur Pascale Dufourcq PU	Président
Monsieur le Professeur François Moreau-Gaudry, PU-PH	Juge
Madame le Docteur Cécile Ged, MCU, PH	Juge
Madame le Docteur Marie Lagarde, PH	Juge
Madame le Docteur Vanessa AUGIS, PH	Juge

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 08 janvier 2018

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
Mme DE MAS MANSAT V. (*)	Hématologie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S.	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C.	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E. (*)	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS-VIATGE C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme DERAEEVE C.	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. Olichon A.	Biochimie
Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALO A.	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme COOL C.	Physiologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. METSU D.	Pharmacologie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
M. PERES M.	Immunologie
Mme SALABERT A.S	Biophysique

Remerciements

Au Professeur Pascale Dufourcq,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous adresse mes remerciements respectueux et ma profonde reconnaissance.

Au Professeur François Moreau-Gaudry,

Vous me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse. Soyez assuré de mes plus sincères remerciements.

Au Docteur Cécile Ged,

Je vous remercie de bien avoir voulu juger mon travail en acceptant d'être membre de ce jury. Merci également pour vos informations précieuses sur les analyses génétiques et pour votre disponibilité.

Au Docteur Marie Lagarde,

Un grand merci pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus grand respect.

Au Docteur Vanessa Augis,

Je te remercie d'avoir accepté d'être membre de ce jury. Merci pour ton aide précieuse, ta gentillesse et ta disponibilité. C'était un vrai plaisir de travailler à tes côtés.

Au Docteur Stéphanie Dulucq,

Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée en me proposant ce travail, pour ta disponibilité, ta gentillesse, ton soutien, ton investissement, tes précieux conseils et ta patience tout au long de ce travail. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi, que ce soit dans le cadre de cette thèse ou lors de mon semestre d'internat. Sois assurée de mon profond respect et de ma plus grande reconnaissance.

A mes parents, pour leur soutien sans faille durant toutes ces années. Merci de m'avoir fait confiance dans tous mes choix et d'avoir toujours été présent, dans les bons comme dans les mauvais moments. Je n'en serais clairement pas là sans vous !

A ma sœur de cœur, merci pour tous ces bons moments passés ensemble et ces souvenirs inoubliables. Tu as toujours été un modèle pour moi et ce n'est pas près de changer !

A mes amies de toujours, mes K. de tnf beach, Maryon, Margaux, Peyton, Amande. A tous ces moments inoubliables depuis toutes ces années, nos vacances déjantées, nos soirées à refaire le monde. Je réalise la chance que j'ai d'avoir des amies aussi exceptionnelles que vous à mes côtés.

A la team de la Run,

Ju, coloc en or et amie exceptionnelle,

Rubish, toujours dans les bons plans (et les mauvais)

Loulou, petite pépite réunionnaise (surtout quand tu chantes du Dadju...)

Ces 6 mois étaient juste complètement dingues à vos côtés, une petite parenthèse enchantée que l'on n'est pas près d'oublier ! Vous n'avez qu'un mot à dire et je repars direct !

Et à tous ceux qui ont la chance d'être resté là-bas, Meg, Esther, Blaise, Gomar, on revient vite vous voir !

A la durexxx team, la meilleure équipe que ce soit sur le terrain ou en soirée !

A ma paupau Delord, ma presque coloc de Jean Jaurès, partenaire de toutes les soirées,

A Anouchka, toujours heureuse et épanouie, un vrai rayon de soleil !

A Chachou la globe trotteuse, Pauline Causs et ses anecdotes croustillantes, Sabine et sa bonne humeur légendaire, Ade notre coach préférée et Lolo, membre officieuse mais incontestée de la team !

A Lisou, une fille au top (presque) toujours motivée,

A Steph, ma stephonne, une coloc en or, tous nos petits moments me manquent... A quand une nouvelle soirée à Saint-Mich' ?

A Athi, partenaire de choc durant cette fameuse première année, et toutes les autres qui ont suivies.

A Florian, Nico, Arnaud, pour ces séances de TP et ces soirées mémorables,

Ces années de fac ont été exceptionnelles grâce à vous, et ça n'est pas près de s'arrêter !

Aux Bordelais,

A Cyrielle, ma cicy, ma grande révélation bordelaise. Une fille exceptionnelle avec un cœur en or. Ces 6 prochains mois s'annoncent mémorables !

A Juliette, Solweig, Coco, Justine, Tonio, Claire, tous ceux qui ont rendu la vie bordelaise si exceptionnelle !

A Stéphane, Julie et Vincent, JG (promis cet hiver on va au roof !), pour ces escape games, ces virées à vélo, et ces apéros !

A Laurent, Alex et Anne, sans qui le semestre d'hémato aurait été beaucoup moins marrant !

A tous les cointernes Toulousains (Marion, Nono, Greg, Cédric, Catoche), Bordelais (Florian, on se retrouve très vite !) et Réunionnais.

A ceux de l'internat Bayonnais, Julien, Kev', Titouan, Mathieu, Alexia, Céline, Maxou loulou. Merci de m'avoir supporté durant ces 6 mois (ça n'a pas dû être facile tous les jours !), pour les petites bières de réconfort, les barbeucs et les bons moments.

Et surtout merci à Elo, sans qui ce semestre n'aurait pas été le même. Une fille géniale, toujours au top ! C'est quand tu veux pour une nouvelle sortie bateau ou une session kite !

A Fanny, une rencontre improbable et de super moments en perspective !

Merci à Valérie, et à tous les techniciens du laboratoire d'hématologie de Pellegrin, qui ont participé de près ou de loin à cette thèse, pour votre investissement et votre gentillesse.

Merci à Frédérique Dubois, pour son aide précieuse et sa disponibilité,

Merci à Maguy, un modèle pour tous, pour ses connaissances et ses précieux conseils.

Et enfin merci à toute la team du labo de Bayonne, Anne-Christine, Fanny, Marie-Laure, Aguirre, Yohan, David, Rémi, et tout particulièrement JG, merci pour ce semestre parfait, votre gentillesse et votre soutien. C'est bien connu que Bayonne est le meilleur labo !

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	14
PARTIE 1 : GENERALITES.....	15
A) LE DEFICIT EN G6PD	15
I- Historique.....	15
II- Epidémiologie.....	16
III- Physiopathologie.....	19
1) Fonction de l'enzyme	19
2) Structure moléculaire de l'enzyme	21
3) Bases génétiques du déficit en G6PD	21
a) Localisation et transmission du gène	21
b) Variants de la G6PD.....	23
c) L'association génotype-phénotype	28
IV-Manifestations cliniques.....	30
1) Ictère néonatal	30
2) L'anémie hémolytique aigue (AHA).....	31
a) Le favisme.....	32
b) l'AHA médicamenteuse.....	33
c) l'AHA suite à un épisode infectieux.....	34
3) L'anémie hémolytique chronique non sphérocytaire (CNSHA)	34
V-Diagnostic biologique.....	35
1) Hémogramme, bilan d'hémolyse et morphologie érythrocytaire	35
2) Mesure de l'activité enzymatique	38
a) Tests qualitatifs	38
1- Spot test fluorescent de Beutler (FST)	38
2- Autres tests qualitatifs utilisables sur le lieu de soin	39
b) Tests quantitatifs.....	41
1- Spectrophotométrie UV	41
2- Inhibition par le Chromate	42
3- Technique cytofluorométrique	42
c) Limites des tests qualitatifs et quantitatifs	44
3) Diagnostic moléculaire	44
VI- Prise en charge et évolution	47
1) Anémie hémolytique aigue (AHA).....	47
2) Ictère néonatal	47

3) Anémie hémolytique chronique non sphérocytaire (CNSHA).....	47
4) Prévention et éducation.....	48
B) VALIDATION ET VERIFICATION DE METHODES.....	51
I- Contexte législatif.....	51
1) Définition d'une validation/vérification de méthode	51
2) Analyses quantitatives/qualitatives	51
3) Définition des besoins du laboratoire	52
4) Vérification continue des performances de la méthode.....	53
II- Etapes de la vérification de méthode	54
1) Description de la méthode	54
2) Evaluation des performances de la méthode	54
a) Fidélité.....	55
1- Répétabilité	55
2- Fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire.....	55
b) Justesse et Exactitude	55
c) Incertitude de mesure	56
1- Principe.....	56
2- Analyse de risque	57
3- Estimation mathématique de l'incertitude de mesure.....	57
d) Comparaison de méthodes	58
e) Etendue de mesure	58
f) Interférences.....	59
g) Intervalles de références.....	59
PARTIE 2 : TRAVAUX PERSONNELS.....	60
I- Contexte, hypothèse et objectifs	60
II- Matériels et méthodes.....	61
1) Principe du dosage	61
a) Technique Biosentec	62
b) Technique Trinity.....	63
2) Préanalytique	64
a) Préparation des culots globulaires pour la technique Biosentec.....	64
b) Préparation de l'hémolysât pour la technique Biosentec.....	65
3) Evaluation des performances de la méthode	65
a) Fidélité.....	65
1- Répétabilité	65

2- Fidélité intermédiaire	67
b) Exactitude et incertitude de mesure.....	68
c) Comparaison de méthode	69
d) Etendue de mesure et interférences	69
e) Influence du préanalytique sur les résultats	69
1- Variabilité inter-opérateur de la préparation des culots globulaires.....	69
2- Etude de la stabilité de l'hémolysât	70
3- Etude de l'influence du remplissage du tube ACD	71
f) Etablissement de nouveaux intervalles de références	73
g) Analyse de risque	73
h) Fiches de formation et d'habilitation du personnel.....	74
4) Etude des résultats des dosages enzymatiques	74
5) Génotypage des variants de la G6PD	74
III-Résultats.....	75
1) Evaluation des performances de la méthode	75
a) Fidélité	75
1- Répétabilité	75
2- Fidélité intermédiaire.....	76
b) Exactitude et incertitude de mesure.....	77
c) Comparaison de méthodes.....	79
d) Etendue de mesure et interférences	81
e) Influence du préanalytique sur les résultats	81
1- Variabilité inter-opérateur de la préparation des culots globulaires.....	81
2- Etude de la stabilité de l'hémolysât	82
3- Etude de l'influence du remplissage du tube ACD	84
f) Etablissement de nouveaux intervalles de références	85
1- Patients âgés de plus de 1 an	86
2- Patients âgés de moins de 1 an	88
g) Analyse de risque	89
h) Fiche de formation et d'habilitation du personnel	90
2) Etude des résultats des dosages enzymatiques	91
3) Résultats du génotypage des variants de la G6PD	96
PARTIE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION	98
BIBLIOGRAPHIE.....	103
ANNEXES.....	111

LISTE DES ABREVIATIONS

6-PG: 6-phosphogluconolactone	G6PD :glucose-6-phosphate déshydrogénase
Aa : acide aminé	GR : globule rouge
ACD : Acide Citrate Dextrose	GSH : glutathione
ACL : Acceptable Change Limit	GTA : guide français d'accréditation
ADN : acide désoxyribonucléique	HAS : haute autorité de santé
AHA : anémie hémolytique aigue	Hb: Hémoglobine
ANSM : agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé	HRM: high resolution melt
ARNm : acide ribonucléique messenger	IC95% : intervalle de confiance à 95%
ATP : adénosine triphosphate	ICR : indice de criticité
CE : conformité européenne	Kb : kilobase
CHU : centre hospitalier universitaire	LBM : laboratoire de biologie médicale
CIL : Comparaison interlaboratoire	LDH : lactate déshydrogénase
CQE : contrôle externe de qualité	MCGRE : maladies constitutionnelles rares du globule rouge et de l'érythroïèse
CQI : contrôle interne de qualité	Med : méditerranéen
CMV : cytomégalo virus	NADP : nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate
Cofrac : comité français d'accréditation	NFS : numération formule sanguine
CSNHA : anémie hémolytique chronique non sphérocytaire	ns : non significatif
CV : coefficient de variation	OMS : organisation mondiale de la santé
DM-DIV : dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>	p: p-value
DO: densité optique	PCR: polymerase chain reaction
EDTA : éthylènediaminetétraacétique	PK : pyruvate kinase
EEQ : évaluation externe de la qualité	rpm : rotation par minute
ET : écart-type	TE : erreur totale
FST : Fluorescent spot test	u : incertitude de mesure
G6P : glucose-6-phosphate	U: unité internationale
	UV : ultraviolet
	VGM : volume globulaire moyen

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Prévalence du déficit en G6PD en pourcentage par pays.....	16
Figure 2 : Rôle de la G6PD dans la voie des pentoses phosphate	19
Figure 3 : Rôle de la G6PD dans la production de NADPH permettant la régénération de la forme réduite du glutathion qui protège le globule rouge contre les peroxydes et superoxydes générés par le stress oxydatif	20
Figure 4 : Structure moléculaire du dimère de la G6PD.	21
Figure 5 : Localisation du gène de la G6PD sur le chromosome X.....	22
Figure 6 : Vue schématique du chromosome X et de la distribution des mutations sur le gène codant pour la G6PD.	23
Figure 7 : Association génotype-phénotype dans la structure tétramérique de la G6PD.....	29
Figure 8 : X100 Frottis sanguin d'un patient déficitaire en G6PD lors d'une crise hémolytique montrant la présence de nombreux hémighosts.....	36
Figure 9 : Microscopie électronique à balayage d'un hémighost (x10000).....	36
Figure 10 : Frottis sanguin coloré au bleu de crésyl montrant la présence de nombreux corps de Heinz.....	37
Figure 11 : Frottis sanguin d'un patient déficitaire en G6PD montrant la présence d'hématies mordues ou « bite cells »	37
Figure 12 : Spot Test Fluorescent de Beutler en lumière UV.....	39
Figure 13 : Tests qualitatifs de dépistage du déficit enzymatique en G6PD actuellement sur le marché pour les zones d'endémie palustre afin de guider le traitement par primaquine.	40
Figure 14 : Spectres d'absorption du NADP+/NADPH en fonction de la longueur d'onde	41
Figure 15 : Principe de la méthode cytofluorométrique.	43
Figure 16 : Démonstration de la méthode cytofluorométrique sur des mélanges artificiels de variants A+ non déficitaire et A-déficitaire en G6PD.	43
Figure 17 : Exemple de courbes de fusion pouvant être observés par technique HRM selon le statut du patient.....	46
Figure 18 : Documents établis pour chaque patient déficitaire en G6PD, comprenant une carte de soins et d'urgence et un livret d'informations et conseils sur la pathologie.....	49
Figure 19 : Représentation schématique des performances évaluées lors d'une vérification/validation de méthode	54
Figure 20 : Diagramme des 5 M pour l'élaboration de la maîtrise des risques.....	57
Figure 21 : Schéma représentatif de la répétabilité sur échantillon sanguin.....	66
Figure 22 : Schéma représentatif de la fidélité intermédiaire sur échantillon sanguin.	67

Figure 23 : Schéma représentatif de la variabilité inter-opérateur de la préparation des culots globulaires	70
Figure 24 : Schéma représentatif de l'étude de la stabilité de l'hémolysât.	71
Figure 25 : Schéma représentatif de l'étude de l'influence du remplissage du tube ACD.....	72
Figure 26 : Comparaison de l'activité enzymatique de la G6PD entre la technique Biosentec et la technique Trinity	79
Figure 27 : Représentation graphique de Bland-Altman pour la comparaison de méthodes Trinity/Biosentec	80
Figure 28 : Représentation graphique de la variabilité inter-opérateur préanalytique. Activité enzymatique G6PD obtenue à partir de culots globulaires réalisés par 2 techniciens différents sur 3 patients	82
Figure 29 : Représentation graphique des variations % de l'activité enzymatique G6PD obtenues sur le dosage de l'hémolysât à t=24h.	83
Figure 30 : Représentation graphique des activités enzymatiques au sein de l'hémolysât à t=0h et t=24h.....	83
Figure 31 : Représentation graphique des variations % obtenues pour les différents volumes de remplissage (4mL, 2mL et 1mL).	84
Figure 32 : Comparaison de l'activité enzymatique G6PD en fonction des réticulocytes obtenue chez les patients non déficitaires > 1 an	86
Figure 33 : Comparaison de l'activité enzymatique G6PD en fonction du sexe chez les patients non déficitaires > 1an ayant un taux de réticulocytes <120G/L	87
Figure 34 : Comparaison de l'activité enzymatique de la G6PD entre les nouveau-nés de 0-7j et les enfants de 8-365j.....	88
Figure 35 : Comparaison du taux de réticulocytes entre les nouveau-nés de 0-7j et les enfants de 8-365j.	88
Figure 36 : Représentation graphique du nombre de dosages mensuels avec la proportion des dosages ayant une activité enzymatique < 6 U/gHb sur la période du 1/08/17 au 31/03/18.....	91
Figure 37 : Diagramme de répartition des prescriptions de dosage de l'activité enzymatique G6PD en fonction des services durant la période du 1/08/17 au 31/03/18.	92
Figure 38 : Diagramme de répartition des contextes cliniques associés aux demandes de dosage de l'activité enzymatique G6PD durant la période du 1/08/17 au 31/03/18.	93
Figure 39 : Proportion de dosages ayant une activité enzymatique < 6 U/gHb en fonction du contexte clinique sur la période du 1/08/17 au 31/03/18.	93
Figure 40 : Représentation graphique des caractéristiques des patients ayant une activité enzymatique < 6 U/gHb sur la période du 1/08/17 au 31/03/18 en termes de sexe, d'âge et d'activité enzymatique.....	95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification internationale des variants de la G6PD en fonction de leur activité établie par l'OMS.....	24
Tableau 2 : Principaux variants polymorphiques de la G6PD et leur distribution	27
Tableau 3 : Seuils de classification des sujets déficitaires en G6 PD en fonction de leur activité enzymatique	40
Tableau 4 : Résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative	52
Tableau 5 : Résultats obtenus pour la répétabilité sur CQI et sur sang	75
Tableau 6 : Résultats obtenus pour la fidélité intermédiaire sur CQI	76
Tableau 7 : Résultats obtenus pour la fidélité intermédiaire sur échantillons sanguins	76
Tableau 8 : Résultats des CQE (UKNEQAS) et estimation de l'exactitude de notre méthode	77
Tableau 9 : Tableaux de calcul de l'incertitude de mesure	79
Tableau 10 : Activité enzymatique de la G6PD (U/gHb) en fonction du volume sanguin prélevé.....	84
Tableau 11 : Récapitulatif des données d'activité enzymatique obtenues chez les patients non déficitaires > 1an.....	87
Tableau 12 : Récapitulatif des données d'activité enzymatique obtenues chez les patients non déficitaires < 1an.....	89
Tableau 13 : Résultats des analyses génétiques obtenus entre juillet 2017 et mai 2018 :.....	96

INTRODUCTION

Le déficit en Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), également appelé « favisme » en raison du risque de survenue d'anémie hémolytique après ingestion de fèves par les personnes déficitaires, est le déficit enzymatique le plus fréquent à travers le monde, touchant plus de 400 millions de personnes (1). Il s'agit d'une maladie héréditaire liée à l'X, due à des mutations sur le gène codant pour la G6PD et provoquant des variants fonctionnels avec de nombreux phénotypes biochimiques et cliniques différents.

Les manifestations cliniques engendrées par le déficit en G6PD touchent majoritairement les hommes, mais ne sont pas rares chez les femmes bien que de transmission liée à l'X, en raison notamment de la fréquence du déficit dans certaines population et du phénomène de lyonisation de l'X. Elles sont majoritairement caractérisées par la survenue de crises hémolytiques suite à un évènement oxydant (infection, prise de médicaments oxydants ou ingestion de fèves) ou la survenue d'ictère néonatal.

Le dosage de l'activité enzymatique de la G6PD est primordial pour la mise en évidence de ce déficit. Celui-ci est indiqué en cas de suspicion clinique de déficit, mais également en préventif avant la prise de certains médicaments contre indiqués en cas de déficit dont la liste actualisée en 2014 et publiée par l'ANSM est présentée en annexe I.

Depuis l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale, une importante restructuration des laboratoires a eu lieu, avec une obligation d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189. Tous les laboratoires français, publics et privés devront être accrédités sur la totalité de leur activité au plus tard le 31 octobre 2020. Cette accréditation permet une reconnaissance de la compétence du laboratoire de biologie médicale (LBM) et une garantie de la fiabilité des résultats rendus dans l'intérêt du patient. L'accréditation d'une méthode de dosage est basée sur la réalisation d'une validation ou d'une vérification de méthode.

C'est dans ce contexte qu'a été réalisée cette thèse, afin de présenter la démarche et les résultats de la vérification de méthode du dosage enzymatique érythrocytaire de la G6PD au CHU Pellegrin à Bordeaux, dans le cadre d'un changement de fournisseur de réactifs.

PARTIE 1 : GENERALITES

A) LE DEFICIT EN G6PD

I- Historique

Déjà au VIème siècle av. J-C dans la Grèce antique, Pythagore recommandait :

« ...κναμων απεχεσθε... » (Tenez-vous loin des fèves) (2)

Le lien entre l'ingestion de fèves et la survenue d'accidents hémolytiques n'a été fait qu'à la fin du XIXème siècle, grâce à de nombreux cas observés. Une relation similaire entre la prise de certains médicaments et la survenue d'anémie aigüe a été établie au début du XXème siècle (3).

L'origine génétique de ce déficit remonte aux années 1940. Les cas de favismes observés concernaient habituellement des sujets méditerranéens mais jamais de sujets originaires d'Europe du Nord. Un autre argument pour une origine génétique a été apporté au cours de la seconde guerre mondiale. La primaquine, un traitement antipaludéen préventif, était alors donnée aux troupes américaines du Sud-Est Asiatique, et provoquait des accidents hémolytiques similaires uniquement chez les militaires afro-américains ou méditerranéens (4),(5).

Ce n'est qu'en 1956 qu'est démontré le lien entre les accidents hémolytiques et l'activité enzymatique basse de la G6PD dans les globules rouges de ces patients (6). L'anomalie génétique touchant le chromosome X a ensuite été découverte en 1958 par Childs, expliquant pourquoi les hommes étaient majoritairement touchés par cette pathologie (3).

En 1959, Beutler décrit le mécanisme biochimique par lequel la prise de médicaments oxydants engendre une anémie hémolytique. La même année, Harks distingue deux types de formes cliniques, une plus sévère touchant les sujets du pourtour Méditerranéen et une deuxième moins sévère touchant les sujets afro-américains.

Le séquençage du gène responsable du déficit en 1986 a engendré la découverte de nombreuses mutations et la modélisation de la G6PD humaine en trois dimensions en 1996 (7) puis par cristallographie en 2000 (8) a permis de mieux comprendre le lien entre ces mutations et les modifications d'activités enzymatiques engendrées.

II- Epidémiologie

Le déficit en G6PD est le déficit enzymatique le plus fréquent au monde, avec un nombre estimé à plus de 400 millions de personnes dans le monde (9). Sa prévalence est particulièrement élevée dans les régions tropicales, pouvant toucher jusqu'à 40% de la population (Figure 1). Les régions les plus touchées sont l'Afrique, le sud de l'Europe, le Moyen-Orient, l'Asie de Sud-est et les îles du Pacifique centrales et méridionales. Cependant, en raison de la modification des flux migratoires, ces allèles déficitaires sont aujourd'hui de plus en plus répandus dans certaines parties d'Europe du nord (10).

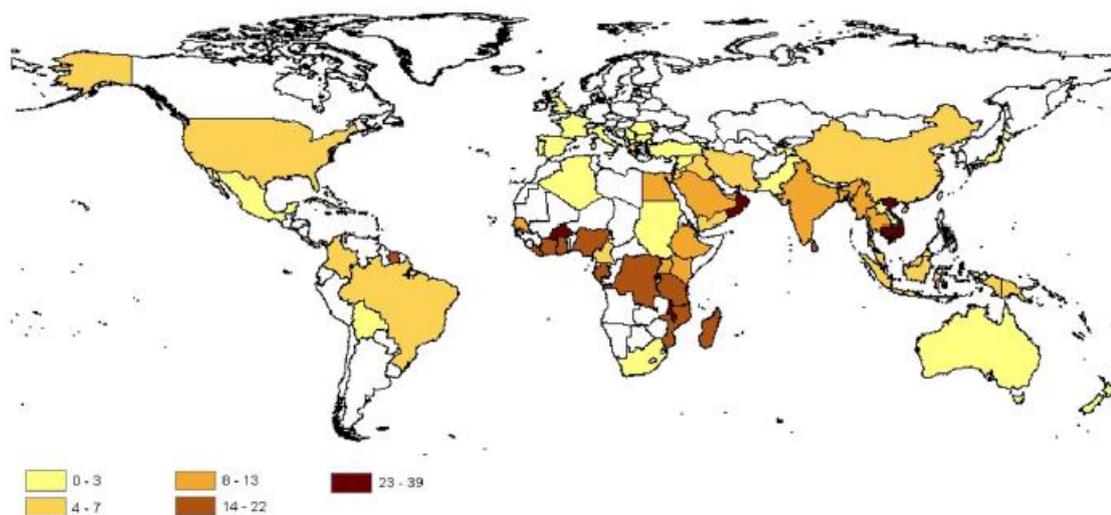


Figure 1 : Prévalence du déficit en G6PD en pourcentage par pays (9)

Une méta-analyse publiée en 2009 estimait une prévalence globale du déficit en G6PD à 4,9%, homme et femme confondus (9).

La prévalence la plus élevée chez les hommes est retrouvée en Afrique sub-saharienne puis au Moyen-Orient, estimées respectivement à 8,5% (IC95%= [7,9-9,1]) et 7,2% (IC95% [6,6-7,2]).

La prévalence retrouvée en Europe, 3,8% (IC95%= [2,9-4,7]), n'est pas significativement différente de celle retrouvée sur le continent américain 5,2 (IC95%= [4,7-5,8]).

Plus localement, la prévalence peut atteindre des niveaux très élevés (Figure 1). Par exemple, l'incidence du déficit chez les hommes appartenant à la communauté juive du Kurdistan est la plus élevée au monde et atteint 70% de la population masculine (11).

Dans le nord du Vietnam, la prévalence du déficit atteint jusqu'à 31% chez certains groupes ethniques (12). Au sultanat d'Oman, chez les enfants de moins de 5 ans, elle atteint 29% dans la région du Dakhiliya (13). Au Burkina Faso, une méta analyse plus récente rapporte

une prévalence à 16,6% (IC95% =[14,5-19]) chez les hommes et 6,5% (IC95%= [5,1-8,1]) chez les femmes (14), légèrement inférieure aux données présentées sur la Figure 1.

En France, les données OMS de 1989 estimaient une prévalence du déficit chez les hommes à 0,39% en France métropolitaine et à 12% en Martinique et Guadeloupe (1). Les chiffres métropolitains sont probablement sous-estimés en raison de leur ancienneté et parce qu'ils ne tiennent pas compte des changements migratoires récents Sud-Nord. Cette prévalence est aujourd'hui estimée à environ 450 000 déficitaires, avec 10 fois plus d'hommes atteints que de femmes. Sur environ 800 000 naissances par an en France, on estime que 9000 nouveau-nés seraient déficitaires (15).

Les zones de forte prévalence mondiale du déficit en G6PD coïncident remarquablement avec les régions d'endémie palustre. Il est maintenant bien établi que le déficit en G6PD confère au sujet porteur une protection contre les formes graves de paludisme à *P. falciparum* (16).

Cette théorie, appelée « the malaria hypothesis » se base sur différentes observations :

La colocalisation géographique entre la distribution mondiale des allèles déficitaires en G6PD et celle du paludisme, s'étendant autour de la ceinture tropicale. Il existe cependant deux exceptions, où les allèles déficitaires en G6PD sont retrouvés à une forte prévalence mais où le paludisme n'est pas retrouvé :

- l'Europe du sud, où le paludisme n'a en fait été éradiqué que lors du XX^{ème} siècle
- l'Amérique du Nord, où le déficit en G6PD concerne exclusivement les immigrés et leurs descendants venant de régions où le paludisme est présent (16).

Les premières études visant à évaluer le lien entre le paludisme et le déficit en G6PD ont donné des résultats quelques peu contradictoires, certaines démontrant un effet protecteur pour tous les génotypes déficitaires en G6PD (17),(18), et d'autres démontrant une protection uniquement présente chez les femmes hétérozygotes (19).

Ruwende *et col.* ont comparé la fréquence de l'allèle déficitaire *G6PD A-* dans deux cohortes d'enfants d'Afrique de l'ouest (Gambie) et Est (Kenya) atteints de paludisme sévère (neuro paludisme ou anémie sévère) à celle observée dans le groupe contrôle (enfants appariés non parasités). Une réduction importante d'environ 50% du risque de paludisme sévère à *P. falciparum* a été retrouvée chez les filles hétérozygotes et les garçons hémizygotés porteurs de l'allèle déficitaire par rapport au groupe contrôle (20). Le niveau de protection conféré est cependant inférieur à celui donné par l'HbS, qui lui est estimé à 90% pour les formes sévères de paludisme à *P. falciparum* (21).

Les études *in vitro*, comparant le développement parasitaire dans des globules rouges de différents variants déficitaires ou des globules rouges normaux, ont démontré que le parasite se développait moins rapidement dans les globules rouges déficitaires (22), (23).

Le mécanisme de protection n'est pas totalement élucidé, mais il semblerait qu'il y ait une forte augmentation de l'activité de la voie des pentoses phosphates dans les hématies parasitées, nécessaire à la métabolisation de l'hémoglobine de l'hôte par le parasite, causant un stress oxydatif important et donc une consommation accrue de NADPH (24). Les hématies déficitaires en G6PD ne pouvant maintenir un haut niveau de production de NADPH, cela pourrait expliquer pourquoi les parasites ne se développent pas aussi bien dans les globules rouges déficitaires que dans les globules rouges normaux.

De plus, une étude de Cappadoro *et col.* montre que les globules rouges déficitaires parasités par des trophozoïtes jeunes de *P. falciparum* sont phagocytés par l'hôte de manière beaucoup plus efficace que les globules rouges normaux, et ce en raison de dommages membranaires provoqués par les conditions oxydatives (25). Cette clairance augmentée des stades précoces du parasite pourrait réduire leur maturation en trophozoïtes âgés et en schizontes, et ainsi conférer un mécanisme de résistance efficace contre les formes graves de paludisme à *P. falciparum* chez les sujets déficitaires.

III- Physiopathologie

1) Fonction de l'enzyme

La Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (G6PD) est une enzyme vitale à la survie de chaque cellule. Elle catalyse la première étape de la voie des pentoses phosphates, voie métabolique du glucose permettant d'une part de générer du NADPH, et d'autre part de fournir du ribose-5-phosphate, précurseur de la synthèse des nucléotides, des acides nucléiques et de coenzymes.

La G6PD convertit le glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconolactone et réduit le cofacteur nicotinamide-adenine dinucléotide phosphate (NADP+) en NADPH (10) (Figure 2).

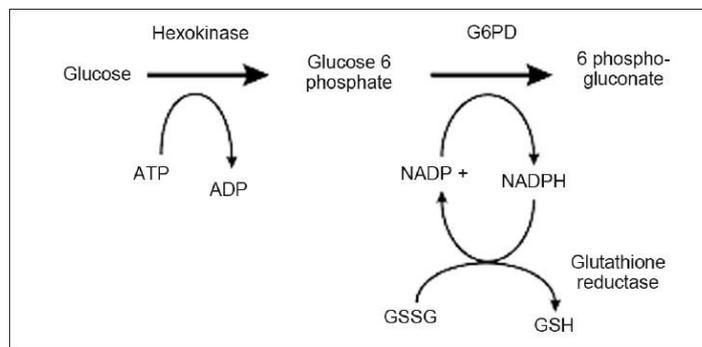


Figure 2 : Rôle de la G6PD dans la voie des pentoses phosphate (26)

La production de NADPH est cruciale à la protection des cellules contre le stress oxydatif, en participant notamment à la régénération de la forme réduite de glutathion.

Le globule rouge est une cellule particulièrement exposée aux radicaux oxydants du fait de l'abondance de l'oxygène et du fer dans son cytoplasme. Cette voie est donc indispensable à sa protection et à celle de l'hémoglobine qu'il contient afin d'assurer son rôle de transport de l'oxygène (27).

La glutathione est présente en grande concentration dans les globules rouges, essentiellement sous forme réduite (GSH). Cette dernière peut réduire les groupes -SH oxydés et réagir avec les peroxydes en s'oxydant sous la forme GSSG via la glutathione peroxydase. Le NADPH est requis pour la régénération du GSSG en GSH par la glutathione réductase, ce qui est considéré comme sa fonction la plus importante chez le globule rouge (Figure 3) (27).

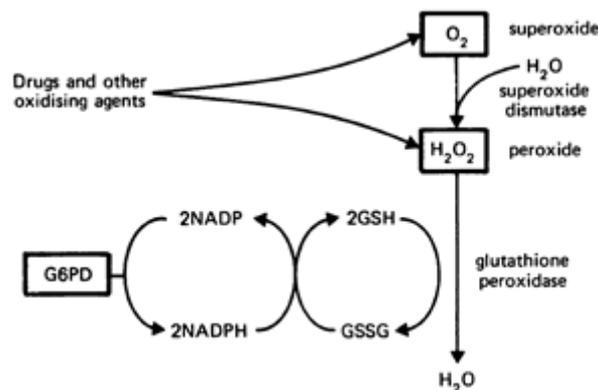


Figure 3 : Rôle de la G6PD dans la production de NADPH permettant la régénération de la forme réduite du glutathion qui protège le globule rouge contre les peroxydes et superoxydes générés par le stress oxydatif (27)

Toute cellule nucléée est capable d'adapter en permanence sa production de G6PD en réponse à un stress oxydatif, contrairement à la lignée érythrocytaire où la synthèse protéique cesse peu après l'énucléation. L'enzyme présente dans un globule rouge est donc celle synthétisée dans les précurseurs érythrocytaires, et le stock d'enzyme disponible diminue régulièrement avec l'âge de la cellule. L'activité enzymatique de la G6PD est donc maximale dans le réticulocyte et le globule rouge jeune (28).

Dans les globules rouges normaux, en dehors de tout stress oxydatif, la G6PD ne fonctionne qu'à environ 2% de son activité maximale théorique.

Dans ces conditions, les taux de G6PD et NADP⁺ sont largement inférieurs aux niveaux de saturation, et le NADPH exerce un rétrocontrôle inhibiteur sur l'enzyme (27).

En condition de stress oxydatif, on observe une oxydation croissante du NADPH, ce qui libère simultanément l'inhibition enzymatique exercée par celui-ci provoquant une augmentation de l'activité enzymatique de la G6PD proportionnelle à la formation de NADP⁺.

C'est donc le rapport de concentration [NADPH]/[NADP⁺] qui contrôle l'activité enzymatique de la G6PD de façon automatique. Cela leur permet d'augmenter leurs capacités réductrices en réponse à l'oxydation, leurs grandes réserves leur permettant de faire face à des niveaux très importants de stress oxydatif.

Dans les globules rouges de patients déficitaires en G6PD, l'activité enzymatique résiduelle ne permet pas une telle adaptation dans la production de NADPH. Cela n'aura que peu d'impact clinique en conditions normales, mais peut avoir des conséquences majeures en présence de stress oxydatif (27) .

2) Structure moléculaire de l'enzyme

La G6PD est une enzyme cytosolique ubiquitaire, active sous forme de dimère ou de tétramère dans un équilibre dépendant du pH.

Un monomère de G6PD est composé de 515 acides aminés (Aa), pour un poids moléculaire d'environ 59 kDa. Chaque monomère comprend deux domaines, un domaine N-terminal (Aa 27-200) comprenant un site de liaison dinucléotidique β - α - β (Aa 38-44) où va se lier le coenzyme NADP⁺, et un second domaine β + α , plus large, constitué d'un feuillet antiparallèle à neuf brins (10). Chaque monomère a la particularité de posséder une molécule de NADP⁺ structurale, se trouvant à proximité de l'interface reliant les deux sous-unités du dimère, entre les deux domaines β + α . (29) (Figure 4). La région N-terminale est stabilisée par un pont disulfure.

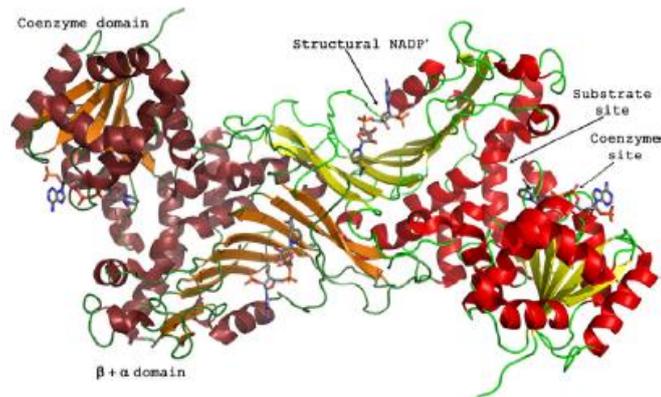


Figure 4 : Structure moléculaire du dimère de la G6PD. Une sous-unité est représentée en rouge et vert alors que la deuxième sous-unité est représentée en différents tons de marron (29)

La transformation des monomères inactifs en enzyme dimérique active ne peut survenir en l'absence de NADP⁺ (30).

3) Bases génétiques du déficit en G6PD

a) Localisation et transmission du gène

Le gène codant la G6PD est localisé sur le locus q28 du bras long du chromosome X, dans la région télomérique. Il est proche du gène codant le facteur VIII de la coagulation et de celui responsable de la vision des couleurs, mutés respectivement dans l'hémophilie A et le daltonisme (10) (Figure 5).

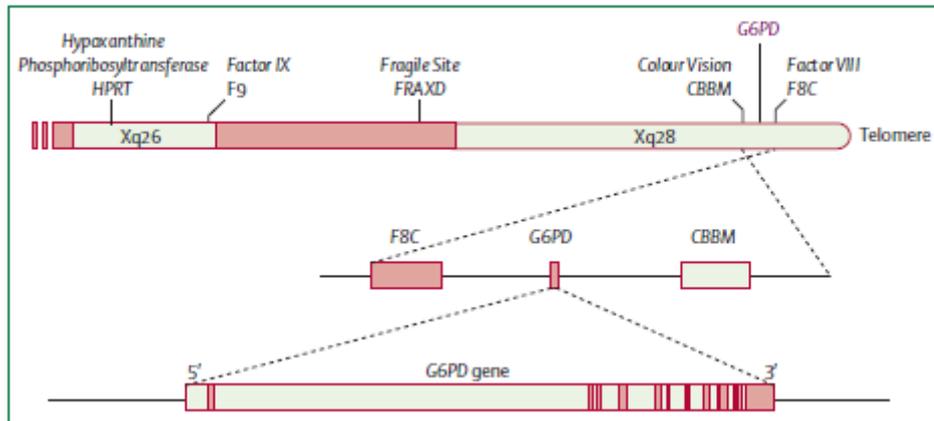


Figure 5 : Localisation du gène de la G6PD sur le chromosome X (10)

La transmission héréditaire du déficit en G6PD présente un schéma typique de pathologie liée à l'X.

Les hommes, ne possédant qu'un seul chromosome X, sont hémizygotés pour le gène codant pour la G6PD. Ils peuvent par conséquent avoir une expression normale du gène ou être déficitaire en G6PD s'ils héritent du gène muté de leur mère porteuse hétérozygote.

Les femmes, qui possèdent deux chromosomes X, donc deux copies du gène, peuvent avoir une expression normale du gène, être hétérozygotes ou, plus rarement, être homozygotes pour le gène muté (notamment dans certaines populations où la fréquence de l'allèle déficitaire peut être très élevée (31)).

En raison du phénomène de lyonisation (inactivation aléatoire d'un des deux chromosomes X dans chaque cellule), les femmes hétérozygotes présentent une mosaïque génétique. Le niveau d'expression de l'enzyme dans chaque cellule dépend du chromosome X inactivé, celui-ci pouvant être diminué au même niveau qu'un homme déficitaire en cas d'inactivation de l'X sain (31). Les femmes hétérozygotes possèdent donc une double population érythrocytaire, et l'activité enzymatique globale en résultant est le plus souvent subnormale. L'expression clinique du déficit chez ces femmes est variable, le plus souvent absente ou modérée.

Il a cependant été observé chez certaines femmes hétérozygotes une inactivation de l'X asymétrique, où le chromosome X porteur du déficit était préférentiellement exprimé, engendrant des manifestations cliniques sévères comparables à celles des hommes déficients (32). Ce phénomène évolue avec l'âge, 70 à 90% des femmes âgées de plus de 70 ans présentent une asymétrie significative d'inactivation de l'X. Il est donc possible qu'une femme hétérozygote avec une activité normale évolue vers une activité intermédiaire ou basse et devienne exposée à un risque d'hémolyse (33). Au *et col.* décrivent chez 132

femmes chinoises avec une médiane d'âge de 80 ans une prévalence du déficit supérieure à celle des nouveau-nés de sexe féminin (5,3% vs 0,27%, $p < 0,0001$). Chez ces femmes hétérozygotes, le déséquilibre d'inactivation de l'X était significativement plus élevé que chez des femmes plus jeunes présentant une activité enzymatique normale. (82% vs 56%, $p < 0,001$) (33).

b) Variants de la G6PD

Le gène codant la G6PD est composé de 13 exons et 12 introns, couvrant 18.5Kb au total. Le codon d'initiation ATG de la traduction protéique se trouve au niveau des paires de bases 115 à 127 de l'exon 2, l'extrémité 5' correspondant à l'exon 1 et une partie de l'exon 2 n'étant pas traduite (Figure 6).

La grande majorité des mutations provoquant un déficit enzymatique en G6PD connue à ce jour touche la séquence codante du gène (34), (35).

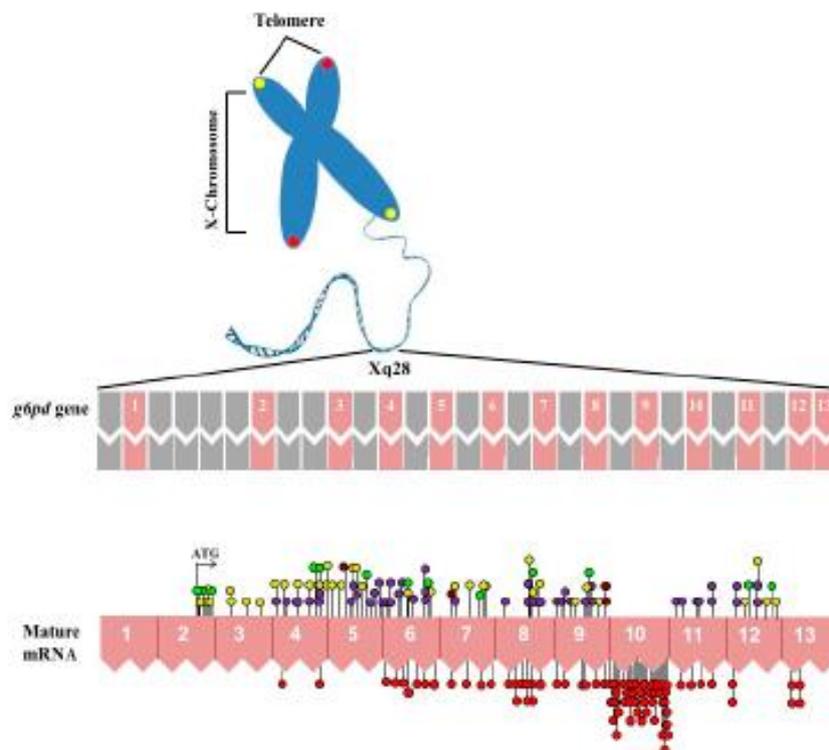


Figure 6 : Vue schématique du chromosome X et de la distribution des mutations sur le gène codant pour la G6PD. Les introns et les exons sont respectivement représentés en gris et rose. En bas, l'ARNm est schématisé et les substitutions connues représentées par des cercles (35)

Plus de 200 variants de la G6PD ont été décrits entre les années 1960 et le début des années 1990 sur la base de leurs caractéristiques biochimiques et physico-chimiques (mobilité électrophorétique, stabilité thermique, pH optimal d'activité, concentration nécessaire en substrat).

A partir de ces données, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a établi une classification internationale des variants de la G6PD en fonction de leur activité enzymatique (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification internationale des variants de la G6PD en fonction de leur activité établie par l'OMS (27)

Classe	Critères	Fréquence	Exemple de variant
Classe I	Déficit enzymatique sévère avec anémie hémolytique non sphérocytaire chronique	Rare	Variant Guadalajara, Beverly Hills, Nashville
Classe II	Déficit enzymatique sévère avec activité enzymatique inférieure à 10% de la normale	Fréquent	Variant Méditerranéen (Med) ou B-
Classe III	Déficit enzymatique discret ou modéré avec activité enzymatique comprise entre 10 et 60% de la normale	Fréquent	Variant A-
Classe IV	Activité comprise entre 60 et 150% de la normale	Fréquent	Variant B, variant A
Classe V	Activité accrue, supérieure à 150% de la normale	Rare	Non rapporté

Le développement des techniques de biologie moléculaire et en particulier le séquençage direct de l'ADN a permis d'identifier un grand nombre de mutations chez les sujets déficitaires en G6PD.

186 mutations ont été rapportées par Minucci *et col.* en 2012 (36) puis complétées à 217 mutations par Gómez-Manzo *et col.* plus récemment en 2016 (35), témoignant de l'hétérogénéité de la maladie. Parmi ces mutations, 182 (83,9%) sont des mutations de type faux-sens, 19 (8,7%) sont des mutations multiples (deux ou plus substitutions), 11 (5,1%) sont des délétions, et 5 (2,3%) sont des mutations touchant les introns.

- Variants à activité enzymatique normale

L'allèle sauvage du gène *G6PD*, correspond à l'allèle *G6PD B* et code le variant B.

Un variant non déficitaire, le variant A est retrouvé chez 30% des sujets africains. Il possède une activité légèrement plus basse et une mobilité électrophorétique plus rapide que le variant sauvage, résultant de la substitution d'un acide-aminé au niveau de l'exon 5 du gène (*G6PD A* ; c.376A>G; p.Asn126Asp) (37).

- Variants à activité enzymatique diminuée

Les deux variants les plus répandus dans le monde sont les suivants :

- **Le variant A-**

Il est retrouvé majoritairement dans les régions tropicales d'Afrique (où il représente 90% des déficits en *G6PD*), mais aussi en Amérique du Nord et du Sud (11% des Afro-Américains), aux Antilles et dans les zones où des populations d'origine africaine sont présentes. Il est également présent en Italie, aux îles Canaries, en Espagne, Portugal et au Moyen-Orient, incluant l'Iran, l'Égypte et Liban (10).

Ce variant dérive directement du variant A, par une mutation supplémentaire s'ajoutant à la substitution c.376 A>G ;p.Asn126Asp (38). Trois variants ont ainsi été décrits, présentant une substitution additionnelle : soit c.202 G>A ;p.Val68Met (*G6PD A*⁽²⁰²⁾) soit c.680G>T ; p.Arg227Leu (*G6PD A*⁽⁶⁸⁰⁾) ou soit c.968 T>C ; p.Leu323Pro (*G6PD A*⁽⁹⁶⁸⁾) située respectivement au niveau de l'exon 4, 7 ou 9 (31), (36).

La *G6PD* est synthétisée en quantité normale, mais sous forme instable in vivo. Elle possède une mobilité électrophorétique identique au type A, mais son activité est réduite à environ 5-15% de la normale, correspondant à la classe III selon la classification de l'OMS (Tableau 1) (39), (27). Cette diminution d'activité touche particulièrement les globules rouges âgés.

- **Le variant Méditerranéen (Med)**

Ce variant est présent dans tous les pays bordant la mer Méditerranée, mais également au Moyen-Orient notamment en Israël où il représente la quasi-totalité des déficits en *G6PD* dans la communauté juive kurde, en Inde et en Indonésie (10). Il s'agit du variant le plus fréquemment retrouvé chez les Caucasiens.

La mutation responsable de ce variant est une substitution c.563C>T ;p.Ser188Phe au niveau de l'exon 6 (40), (36).

La mutation entraîne une diminution de synthèse protéique. L'activité enzymatique résiduelle représente environ 1% de la normale, soit un variant de classe II selon l'OMS (27).

Cette diminution d'activité touche toute la population de globules rouges, et entraîne des manifestations cliniques plus sévères.

Dans certaines populations autour du golfe persique, les deux variants A- et Med coexistent.

De nombreux autres variants existent (Tableau 2), certains sont très répandus comme le variant Union (*G6PDc.1360 C>T* ; p.Arg454Cys au niveau de l'exon 11) et le variant Seattle (*G6PD c.844G>C* ; p. Asp282His au niveau de l'exon 8), correspondant respectivement à des variants de classe II et III selon l'OMS (31).

Dans le sud-est Asiatique, les variants Viangchan (*G6PDc.871G>A* ; p.Val291Met au niveau de l'exon 9, déficit de classe II) et Mahidol (*G6PDc.487G>A* ; p.Gly163Ser au niveau de l'exon 6, déficit de classe III) sont les 2 variants les plus fréquemment rencontrés, alors qu'en Chine on retrouvera préférentiellement les variants Canton (*G6PDc.1376G>T* ; p.Arg459Leu au niveau de l'exon 12) et Kaiping (*G6PDc.1388G>A* ; p.Arg463His au niveau de l'exon 12), tous deux responsables de déficit de classe II (1), (31).

Les principaux variants et leur distribution sont résumés dans le Tableau 2 (31).

Tableau 2 : Principaux variants polymorphiques de la G6PD et leur distribution (31)

Name of mutation	Amino acid change(s)	Comments	Distribution
Gaohe	32His->Arg		China, Thailand, Malaysia
Honiara	33Ile->Met, 44Ala->Gly	May be neutral mutation on a G6PD Union background	Solomon Islands
Orissa	454Arg->Cys		Tribal India, Mauritius, Malaysia
Aures	48Ile->Thr		Algeria, Kuwait, Saudi Arabia, UAE, Spain
Metaponto	58Asp->Asn		Italy
A ⁻	68Val->Met; 126Asn->Asp	Found in people of African origin all over the world	Africa, Spain, Portugal, Middle East, USA, Cuba, Brazil etc
Namoru	70Tyr->His		Tribal India (South)
Ube-Konan	81Arg->Cys	Most common variant in Japan	Japan
Vanua Lava	128Leu->Pro		Malaysia, Indonesia, Vanuatu
Mahidol	163Gly->Ser	Common variant in Thais	China, South East Asia
Santamaria	181Asp->Val; 126Asn->Asp		Spain, Mexico, Costa Rica, Algeria, Sicily
Mediterranean	188Ser->Phe	Most common mutation in many Mediterranean and Middle East countries and on Indian subcontinent. Found in people of Mediterranean origin anywhere in the world. May have arisen independently in the Mediterranean area and in India.	India, Malaysia, Italy, Greece, Spain Portugal, Middle East, Croatia, Brazil etc
Coimbra	198Arg->Cys		Italy, Malaysia, Indonesia, Cambodia
Seattle	282Asp->His	Widespread. Only variant found in a study in Canary Isles	Sardinia, Brazil, Mexico, Spain, Portugal, Canary Isles, Italy, Greece. Croatia
Montalbano	285Arg->His		Italy
Viangchan	291Val->Met	Most common variant in Thailand and Cambodia	China, Thailand, Malaysia, Cambodia, Laos, Indonesia
Kerala/Kalyan	317Glu->Lys		India
A ⁻ (968)	323Leu->Pro, 126Asn->Asp		Spain
Chatham	335Ala->Thr		India, Indonesia, Italy, Iran, Malaysia, Kuwait, Indonesia, China, Spain, Japan
Chinese-5	342Leu->Phe		China, Malaysia, Thailand
Ierapetra	353Pro->Ser		Singapore
Cassano	449Gln->His		Greece
Union	454Arg->Cys	Widespread	Italy, Greece
Canton	459Arg->Leu	Most common variant found in a study in Singapore and amongst Malaysian Chinese. Common amongst Chinese.	Solomon Islands, Vanuatu, Croatia, China, Italy, Spain, Mexico, Cambodia, Thailand, Malaysia
Cosenza	459Arg->Pro	Most common mutation in a study in Croatia	China, South East Asia
Kaiping	463Arg->His	Common in Chinese. Most common variant in Flores, Indonesia	Italy, Iran, Croatia

c) L'association génotype-phénotype

Le « phénotype clinique » résultant du génotype dépend entre autre de la localisation de la mutation mais également du type de mutation (Figure 7).

Il est probable que l'absence complète de G6PD soit létale au cours de la vie embryonnaire, aucune mutation entraînant un décalage du cadre de lecture ou l'apparition d'un codon stop n'ayant été décrite chez l'homme ou chez la souris (41).

En étudiant la séquence d'acides aminés de nombreux variants de la G6PD, Notaro *et col.* ont montré qu'il existait une corrélation entre les acides aminés impliqués dans les mutations responsables du déficit enzymatique et les résidus modérément conservés de la protéine. Les mutations ne touchent que très rarement les résidus hautement conservés, où elles pourraient être létales, et ceux faiblement conservés, vraisemblablement car leur mutation ne serait pas responsable de déficit (42).

Les résidus essentiels à l'activité ou impliqués dans la liaison au substrat ou au coenzyme seront donc peu impactés. Aucune mutation touchant directement le site actif n'a été rapportée à ce jour.

Cette limitation structurelle explique pourquoi certaines mutations sporadiques ont pu apparaître plus d'une fois chez des personnes non apparentées de régions éloignées dans le monde, mais également pourquoi on observe certains « points chauds » où plusieurs mutations différentes ont été rapportées provoquant des phénotypes cliniques distincts (43) (Figure 7).

- **Mutations sévères (Classe I de l'OMS) :**

La majorité des mutations responsables d'une anémie hémolytique non sphérocytaire chronique (CSNHA) (déficit sévère de classe I) est concentrée au niveau de l'interface entre les 2 sous-unités du dimère ou au niveau de la molécule de NADP+ structurale (Figure 7). Les mutations touchant l'interface du dimère siègent majoritairement au niveau des exons 10 et 11 et altèrent les liaisons faibles (hydrophobes, ioniques...) provoquant une diminution de la stabilité thermique de l'enzyme (10), (29).

- **Mutations responsables de déficits de classe II et III de l'OMS :**

Il est plus difficile d'établir un lien entre les variants polymorphes de classe II et III, les mutations étant réparties dans toute la structure de l'enzyme, les modifications structurales pouvant être très subtiles et l'activité enzymatique quasi-normale.

Le seul point commun est que l'activité enzymatique diminue plus rapidement que celle d'une enzyme normale sur une période de quelques jours ou semaines dans la vie d'un globule rouge.

Le variant A- s'est avéré être fortement instable *in vitro*, par modification de sa structure tertiaire. Dans le cas du variant A- le plus fréquent (*G6PD A*⁻⁽²⁰²⁾), les 2 changements d'Aa Val68M et Asn126Asp codés respectivement par les 2 substitutions c.202 G>A et c.376 A>G, engendrent une perte d'interaction entre les feuillets β et hélice α , provoquant un dépliement de l'enzyme qui l'expose davantage à la dégradation (39).

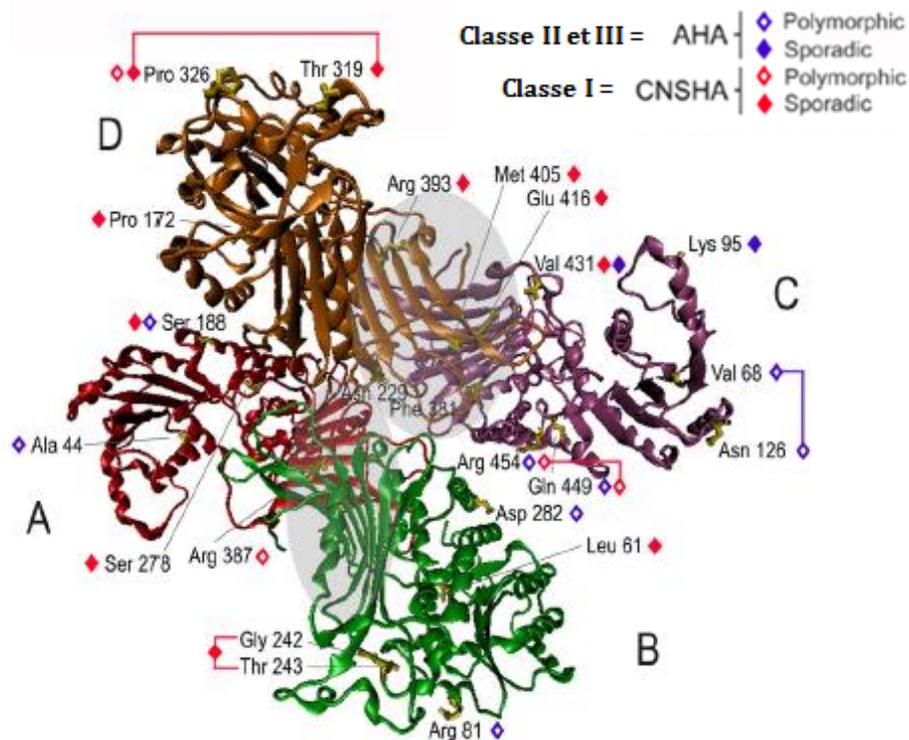


Figure 7 : Association génotype-phénotype dans la structure tétramérique de la G6PD. Chaque sous-unité identique est identifiée de A à D, avec localisation des mutations conduisant à un phénotype clinique. Les losanges bleus et rouges indiquent les localisations de mutations responsables respectivement d'anémie hémolytique aiguë (AHA), correspondant aux classes II et III de l'OMS et d'anémie hémolytique chronique non sphérocytaire (CNSHA), correspondant à la classe I de l'OMS. Les losanges remplis et non remplis indiquent respectivement les mutations polymorphiques et sporadiques (31).

Le phénomène de lyonisation de l'X chez les femmes influence également le phénotype clinique, notamment chez les femmes hétérozygotes. Dans de rares cas, l'X « sain » est majoritairement inactivé en raison de la présence d'une mutation délétère sur un autre gène du chromosome. Le second chromosome X porteur de la mutation est donc préférentiellement exprimé, provoquant une activité enzymatique fortement diminuée (32). Comme vu précédemment (paragraphe III-3-a), l'âge peut également modifier l'équilibre de lyonisation de l'X et donc influencer l'activité enzymatique et le phénotype clinique (33).

IV-Manifestations cliniques

La majorité des patients déficitaires sont asymptomatiques.

Le diagnostic de déficit en G6PD peut cependant être évoqué sur certains symptômes cliniques ou dépisté chez un sujet asymptomatique dans le cadre d'une enquête familiale, avant l'administration d'un médicament oxydant contre-indiqué en cas de déficit, ou dans le cadre du bilan d'une autre anomalie génétique du globule rouge (drépanocytose, thalassémie...) (1).

Les principales présentations cliniques sont l'ictère néonatal et l'anémie hémolytique aigue, celle-ci faisant suite à un stress oxydatif dû à la prise d'un médicament oxydant, de fèves, ou suite à un épisode infectieux. L'anémie hémolytique chronique est exceptionnelle et caractérise les déficits de classe I (1).

1) Ictère néonatal

Le déficit en G6PD est une cause majeure d'ictère néonatal dans le monde.

L'ictère néonatal est défini comme un taux sanguin anormalement élevé de bilirubine, pouvant provoquer en absence de traitement une encéphalopathie bilirubinique aigue parfois irréversible ou un ictère nucléaire, responsable de dommages neurologiques permanents (44). Ce risque de neurotoxicité est décrit pour un taux de bilirubine circulant >340 µmol/L.

La bilirubine, produit du catabolisme de l'hème, est transportée sous forme liée à l'albumine dans la circulation sanguine jusqu'au foie, où elle va subir une glucuronoconjugaison afin d'être excrétée par la bile dans l'intestin, puis éliminée dans les selles. Une partie de cette bilirubine conjuguée est hydrolysée en bilirubine non conjuguée dans l'intestin et réabsorbée dans le sang par la circulation entéro-hépatique.

L'ictère néonatal témoigne du dysfonctionnement plus ou moins transitoire de ce métabolisme. Différents facteurs sont en cause:

- la production accrue de bilirubine (2-3 fois supérieure à celle de l'adulte)
- l'immaturation hépatique et donc la diminution de conjugaison de la bilirubine libre
- l'augmentation du cycle entéro-hépatique (absence de flore bactérienne)

Environ un tiers des nouveau-nés de sexe masculin présentant un ictère néonatal ont un déficit en G6PD (10), ce dernier étant cependant moins fréquent chez les nouveau-nés de sexe féminin (45).

L'ictère néonatal lié au déficit en G6PD se manifeste généralement entre 1 et 10 jours après la naissance (1), soit dans un délai similaire à celui de l'ictère physiologique mais plus

tardivement que celui provoqué par l'alloimmunisation fœto-maternelle. Il est habituellement isolé, sans signes d'hémolyse associés : taux d'hémoglobine normal, test de Coombs négatif témoignant de l'absence d'incompatibilité fœto-maternelle, et sans signes d'infections associés.

Le mécanisme par lequel le déficit en G6PD entraîne un ictère néonatal n'est pas encore totalement élucidé.

Une hypothèse était que l'administration systématique de vitamine K1 chez les nouveau-nés engendrait un stress oxydatif pouvant être partiellement responsable de l'ictère néonatal chez les nouveau-nés déficitaires en G6PD. Kaplan *et col.* ont montré que les différences de concentration en glutathione réduit (GSH) et en méthémoglobine (indicateurs de dommages oxydatifs du globule rouge) avant et après administration de vitamine K1 chez les nouveau-nés déficitaires en G6PD n'étaient pas significativement différentes, réfutant cette hypothèse (46).

Il semblerait que le rôle de l'hémolyse dans l'hyperbilirubinémie soit mineure, et que celle-ci résulterait davantage d'une réduction des capacités de conjugaison hépatique de la bilirubine (47), (48). En effet, l'association du déficit en G6PD à certains polymorphismes du gène UGT1A1 responsable de la glucuroconjugaison hépatique augmente le risque de développer un ictère néonatal (49). L'exposition simultanée à des facteurs environnementaux oxydants tels que certains antiseptiques ou potions ombilicaux, l'ingestion maternelle de fèves, de certains thés aux plantes ou de médicaments oxydants peuvent précipiter une hémolyse sévère dépassant les capacités de conjugaison hépatique et engendrant une hyperbilirubinémie sévère (47).

La physiopathologie de l'ictère néonatal est vraisemblablement le résultat d'une interaction complexe entre facteurs de risques génétiques et environnementaux (47).

Il est plus fréquemment observé dans les déficits sévères tel que le variant Méditerranéen que dans les déficits modérés comme le variant A-.

2) L'anémie hémolytique aigue (AHA)

L'anémie hémolytique aigue se manifeste sous forme d'épisodes d'hémolyse aigus faisant suite à l'ingestion de fèves, la prise de médicaments oxydants ou à une infection.

Dans ces conditions de stress oxydant, la présence de radicaux libres en excès va provoquer une transformation accélérée d'hémoglobine en méthémoglobine ainsi qu'une oxydation de polypeptides membranaires rigidifiant la membrane du globule rouge. Les globules rouges les plus sévèrement endommagés seront rapidement détruits dans la circulation sanguine alors que d'autres hématies fragilisées seront phagocytées par les macrophages de la rate

(50). Le mécanisme impliqué associe donc une hémolyse intravasculaire à une hémolyse extravasculaire.

La crise hémolytique débute 2 à 3 jours après exposition à l'évènement oxydant, et se manifeste cliniquement par les signes habituels d'une anémie (asthénie, pâleur), pouvant s'accompagner de signes témoignant d'une hémoglobinurie (douleurs abdominales ou lombaires, urines de couleur rouge ou brune). Un ictère avec augmentation du taux de bilirubine apparaît secondairement.

L'hémolyse peut se compliquer principalement chez l'adulte d'une insuffisance rénale aiguë et nécessiter une courte période de dialyse.

L'anémie se majore jusqu'à 7-8 jours après l'arrêt de l'exposition oxydante, et le taux d'hémoglobine commence à remonter au bout de 7 à 10 jours, au début de la crise réticulocytaire (1).

Les agents susceptibles de provoquer un accident hémolytique aigu ont en commun la propriété d'être des substances ayant des propriétés oxydantes.

a) Le favisme

Les manifestations cliniques dues aux crises hémolytiques suivant l'ingestion de fèves sont décrites depuis la fin du XIX^{ème} siècle. Il s'agit d'une des manifestations les plus graves du déficit en G6PD, notamment dans les pays méditerranéens où les fèves sont un met habituel.

Le favisme s'accompagne de signes d'hémolyse souvent plus précoces et sévères que ceux observés dans les autres situations de stress oxydatif. L'hémolyse débute quelques heures après l'ingestion de fèves, accompagnée rapidement de signes d'hémoglobinurie puis d'un état de choc.

Les fèves contiennent deux glycosides, la vicine et la convicine, dont l'hydrolyse conduit à la divicine et à l'isocoumaril qui possèdent des propriétés oxydantes proches de celles de la quinine (37).

Deux variétés sont concernées : *Vicia faba* (fèves ou féveroles), la plus répandue, et *Vicia sativa* (Vesce). Elles entraînent une hémolyse chez les sujets déficitaires en cas d'ingestion quel que soit leur mode de préparation ou de conservation. De même, ces molécules passant dans le lait maternel, la consommation de fèves par une mère peut induire une hémolyse chez le nouveau-né déficitaire en cas d'allaitement au sein.

b) l'AHA médicamenteuse

De nombreux médicaments possèdent des propriétés oxydantes. L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) a établi une liste de ces médicaments, qui est actualisée régulièrement (Annexe I).

Historiquement, les antipaludéens ont été les premiers décrits comme responsables d'accidents hémolytiques lors de leur administration chez certains soldats afro-américains lors de la seconde guerre mondiale (4).

La chloroquine agit en pénétrant dans les vacuoles érythrocytaires riches en catabolites de l'hémoglobine produits par le parasite dans les hématies impaludées. Ce médicament diminue le taux de glutathion disponible, rendant la détoxification plus difficile et augmentant l'effet toxique des radicaux oxygénés libérés.

La primaquine agit de façon similaire, via l'un de ses métabolites hépatiques qui consomme également du GSH par le biais d'un stress oxydant sur l'érythrocyte (5).

La chloroquine est actuellement indiquée dans le traitement des formes non compliquées de paludisme à *P. non falciparum* (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*).

La primaquine est le seul médicament permettant la prévention des accès de reviviscence à *P. vivax* et *P. ovale*, en éradiquant les formes quiescentes hépatiques.

Ils sont donc tous deux largement utilisés en zones d'endémie palustre, qui correspondent également aux zones de forte incidence du déficit en G6PD, ce qui en fait un problème majeur de santé publique (51).

D'autres médicaments ont par la suite montré des effets similaires, dû à leur action oxydante, et dont le mécanisme de toxicité est plus ou moins bien connu.

Les sulfamides et le chloramphénicol font également baisser le taux de GSH d'une façon dose-dépendante (52). Certains anesthésiques agiraient en inhibant l'activité de la G6PD (53).

La grande hétérogénéité génétique du déficit en G6PD fait qu'un médicament sans danger chez certains sujets déficitaires ne l'est pas nécessairement chez tous. Certaines substances peuvent en effet provoquer une crise hémolytique chez les sujets porteurs du variant Méditerranéen mais pas chez ceux porteurs du variant A- (37).

Le risque et la sévérité de l'hémolyse est dépendante de la dose et de la durée du traitement, aussi bien que de la présence de stress oxydant additionnel, par exemple un épisode infectieux concomitant.

Il existe donc de grandes différences de variabilités interindividuelles, qui sont à rattacher à de multiples facteurs, comme les différents types de déficit en G6PD, les différences génétiques dans le métabolisme des médicaments, l'effet additionnel d'agents oxydants environnementaux ou infectieux.

c) l'AHA suite à un épisode infectieux

L'infection est probablement la cause la plus fréquente de crise hémolytique chez le sujet déficitaire en G6PD. De nombreux épisodes hémolytiques vraisemblablement imputables à des épisodes infectieux passés inaperçus ont été attribués à tort à des médicaments (37).

Les étiologies bactériennes et virales pouvant être impliquées sont nombreuses, mais les principales causes sont les virus de l'hépatite A, B et E, le CMV (54), la pneumopathie lobaire à pneumocoque (55) et la fièvre typhoïde.

L'hémolyse est dans ce cas d'intensité souvent plus modérée, et l'augmentation du taux de bilirubine peut être masquée par une atteinte biologique hépatique fréquente lors d'infections virales.

Le mécanisme impliqué semble être la libération de substances oxydantes par les leucocytes au cours de la phagocytose.

3) L'anémie hémolytique chronique non sphérocytaire (CNSHA)

Dans de rares cas sporadiques, le déficit en G6PD peut engendrer une hémolyse chronique de sévérité variable, pouvant être aggravée par un stress oxydatif. Les variants responsables de CNSHA ont été décrits partout dans le monde, sans relation apparente avec une origine ethnique ou une endémicité de la pathologie (56). Ils ont été regroupés dans la classe I de la classification de l'OMS (27). Plus de 70 mutations causales ont été rapportées.

Le diagnostic de CNSHA lié à un déficit en G6PD se fait généralement dans l'enfance, et est basé sur les manifestations cliniques, quel que soit le niveau d'activité de la G6PD, généralement très bas.

Dans la CNSHA, l'hémolyse est chronique et intra tissulaire. Les globules rouges fragilisés sont détruits par les macrophages lors de leur passage splénique.

Comme dans les autres causes d'anémies hémolytiques héréditaires, la plupart des patients avec une CNSHA lié à un déficit en G6PD ont un antécédent d'ictère néonatal sévère, une anémie chronique exacerbée par un stress oxydatif nécessitant des transfusions sanguines (57), des lithiases biliaires, une réticulocytose et une splénomégalie (16). Ces patients peuvent également développer des crises hémolytiques aiguës en présence d'agents oxydants identiques à ceux des autres variants.

V-Diagnostic biologique

1) Hémogramme, bilan d'hémolyse et morphologie érythrocytaire

Lors d'un épisode d'hémolyse aiguë, l'hémogramme retrouve une anémie parfois très sévère, accompagnée d'une réticulocytose élevée traduisant le caractère régénératif de cette anémie. La crise réticulocytaire n'apparaissant qu'au bout de 7 à 10 jours après l'exposition à l'agent oxydant, la réticulocytose peut donc être absente en cas de bilan précoce.

Les marqueurs classiques d'hémolyse sont perturbés : haptoglobine effondrée, LDH et bilirubine libre (ou indirecte) élevés.

En dehors de ces épisodes aigus, l'hémogramme est totalement normal chez les patients déficitaires, hormis chez les rares patients atteints de déficit de classe I (CNSHA) où une anémie chronique régénérative avec marqueurs d'hémolyse perturbés sera retrouvée.

Sur le frottis sanguin, après coloration au May Grunwald Giemsa, des anomalies cytologiques érythrocytaires évocatrices du déficit en G6PD pourront être recherchées: hématies fantômes ou hémighost (Figure 8) (58) hématies mordues ou « bite cells » (Figure 11) (59) ou des corps de Heinz après coloration supravitale au bleu de crésyl (Figure 10).

La présence d'hémighosts est connue pour être associée aux dommages oxydatifs provoquant une méthémoglobinémie, aux corps de Heinz et à un taux de GSH diminué (58). La microscopie électronique a montré que les hémighosts résultent d'une apposition antéro-postérieure étroite de la membrane sur une partie de la cellule, contenant seulement une fine couche d'hémoglobine, tandis que la partie restante de la cellule devient plus épaisse et sphéroïdale et contient la majeure partie de l'hémoglobine. Il en résulte une hématie semblant partiellement vidée de son hémoglobine (Figure 8 et 9) (58).

Ils peuvent également être observés chez des patients non déficitaires présentant une hémolyse secondaire à certains toxiques méthémoglobinisants.

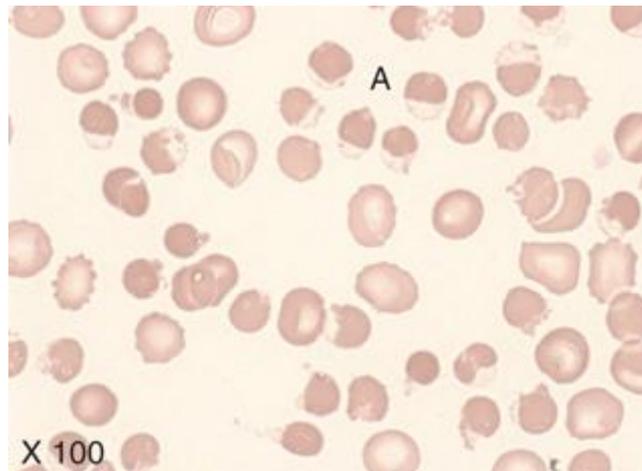


Figure 8 : X100 Frottis sanguin d'un patient déficitaire en G6PD lors d'une crise hémolytique montrant la présence de nombreux hémighosts (60)

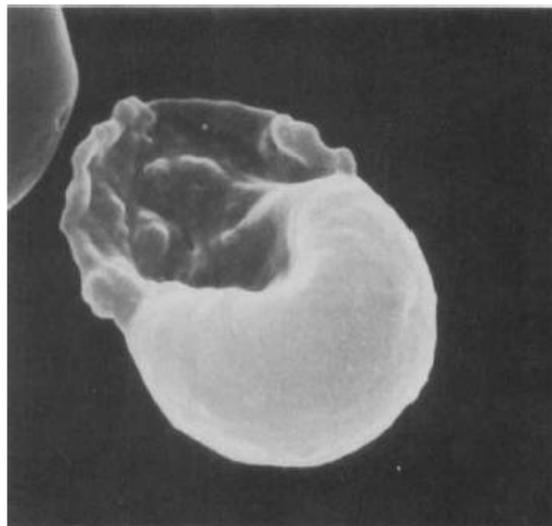


Figure 9 : Microscopie électronique à balayage d'un hémighost (x10000) (58)

Comme vu précédemment, les globules rouges déficitaires en G6PD et exposés aux oxydants perdent rapidement tout leur stock de glutathion réduit. L'hémoglobine est alors oxydée en méthémoglobine, qui forme de petites masses insolubles collées à la membrane et appelées corps de Heinz.

La mise en évidence de corps de Heinz dans les hématies peut se faire par coloration supravitale au bleu de crésyl (Figure 10). Leur recherche peut être réalisée pendant l'épisode hémolytique, ou en dehors des crises après ajout au sang d'un oxydant (AcétylPhényl Hydrazine ou APH) induisant rapidement leur formation chez les patients déficitaires (recherche de corps de Heinz provoquée).

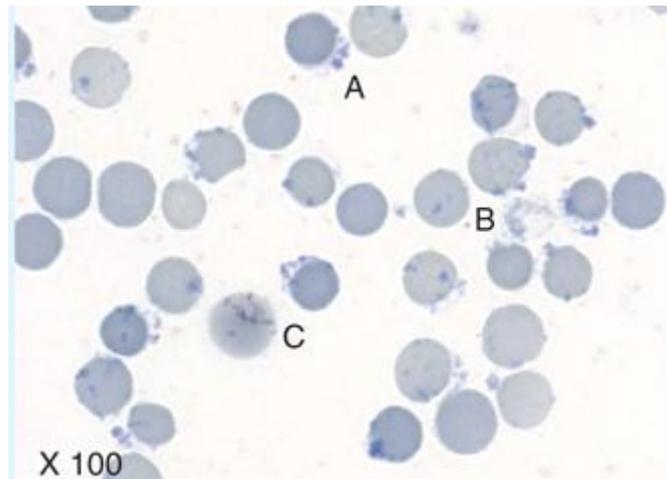


Figure 10 : Frottis sanguin coloré au bleu de crésyl montrant la présence de nombreux corps de Heinz (60)

Les corps de Heinz peuvent également être observés dans d'autres pathologies érythrocytaires (certaines hémoglobinoses rares comme les hémoglobines instables, les thalassémies).

Les hématies mordues correspondent à des hématies dont une partie (celle contenant les corps de Heinz) a été phagocytée par les macrophages de la rate. Elles peuvent également être observées dans les hémoglobines instables (principalement l'hémoglobine Köln) (Figure 11).

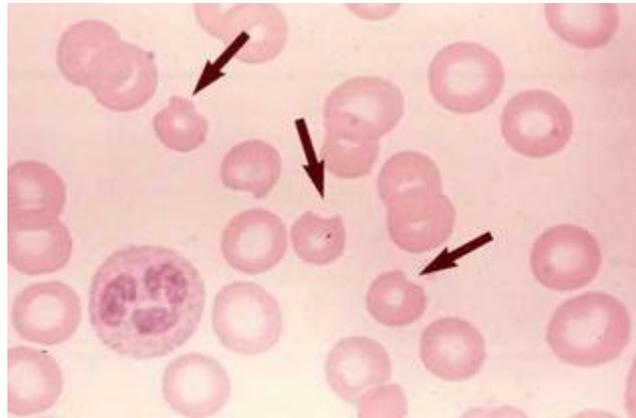


Figure 11 : Frottis sanguin d'un patient déficitaire en G6PD montrant la présence d'hématies mordues ou « bite cells » (60)

L'analyse de la morphologie érythrocytaire est très fréquemment réalisée dans le cadre des anémies hémolytiques pour la recherche de schizocytes. Une fois le diagnostic d'hémolyse mécanique écarté, il est donc très facile pour le biologiste de rechercher d'autres anomalies érythrocytaires pouvant orienter vers une autre cause d'hémolyse comme le déficit en G6PD, même si ces anomalies ne sont pas toujours spécifiques.

L'analyse du frottis sanguin peut être particulièrement utile dans certains cas où le diagnostic étiologique de l'anémie hémolytique n'est pas évident. Par exemple, l'anémie hémolytique peut présenter un caractère arégénératif inhabituel suite à une infection virale provoquant une érythroblastopénie secondaire. L'orientation cytologique vers un déficit en G6PD, confirmé par un dosage enzymatique, peut permettre dans ce cas d'éviter la réalisation d'un geste invasif, le myélogramme (60).

De façon générale, l'analyse du frottis sanguin doit faire partie du bilan systématique d'une anémie hémolytique.

2) Mesure de l'activité enzymatique

Le diagnostic définitif du déficit en G6PD est basé sur la mesure de l'activité enzymatique. La méthode de référence est une analyse quantitative spectrophotométrique du taux de production de NADPH (61), (62). Cette méthode nécessitant du matériel coûteux et un préanalytique maîtrisé n'est cependant pas adaptée au dépistage rapide des populations à risque en zone endémique de paludisme.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) préconise en effet la recherche de déficit en G6PD avant tout traitement par primaquine (51). Des tests qualitatifs ont donc été développés dans ce but, permettant rapidement la détection des sujets présentant un déficit profond en G6PD.

a) Tests qualitatifs

1- Spot test fluorescent de Beutler (FST)

Ce test a été développé par Beutler en 1966 et a été la méthode de dépistage qualitative recommandée pour le déficit en G6PD au cours des dernières décennies (63). C'est un test direct permettant d'identifier visuellement le NADPH produit par la G6PD sous lumière UV de grande longueur d'onde.

Il consiste à incuber un hémolysât issu d'un échantillon de sang total du sujet en présence de réactif contenant du Glucose-6-Phosphate et du NADP⁺, puis de le déposer sur un papier filtre. Le NADPH, sous-produit de la réaction chimique, est fluorescent et l'intensité de cette fluorescence est directement proportionnelle à l'activité de la G6PD. Le papier filtre est ensuite placé dans une boîte noire sous lumière UV de grande longueur d'onde. L'absence de fluorescence traduit une absence de production de NADPH et donc un déficit en G6PD (64), (65) (Figure 12).

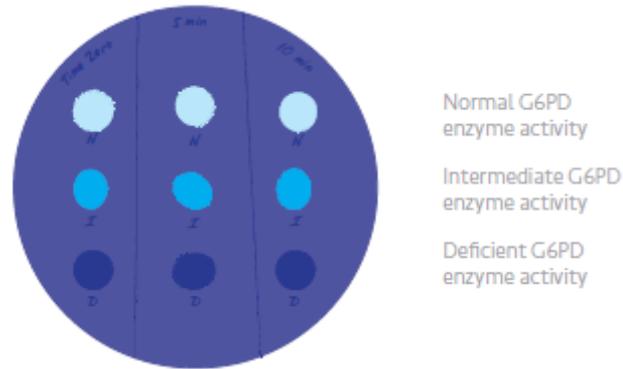


Figure 12 : Spot Test Fluorescent de Beutler en lumière UV.

Fluorescence due à la production de NADPH. Un sujet avec une activité normale en G6PD aura une fluorescence modérée à forte après 5 minutes, et forte après 10 minutes. Un sujet avec une activité intermédiaire aura une faible fluorescence à 5 minutes et une fluorescence modérée à 10 minutes. Un sujet déficitaire n'aura que peu ou pas de fluorescence après 5 et 10 minutes.

L'activité enzymatique étant rapidement dégradée par la chaleur, des résultats faussement positifs peuvent être observés si l'analyse n'est pas réalisée rapidement après prélèvement et que l'échantillon n'est pas conservé à +4°C (66).

Cette technique nécessite une infrastructure de laboratoire minimale (chaîne du froid, éclairage UV de grande longueur d'onde, personnel expérimenté pour une interprétation correcte du test) et ne se prête donc pas au dépistage sur le terrain.

2- Autres tests qualitatifs utilisables sur le lieu de soin

Ces tests, récemment arrivés sur le marché, nécessitent du sang total prélevé par piqûre au bout du doigt et peuvent être réalisés et interprétés au lit du malade en moins de 30 min. Les deux tests chromatographiques actuellement sur le marché et ayant fait l'objet d'une évaluation par l'OMS en 2014 sont le BinaxNOW[®] G6PD (Alere) et le CareStart[®] G6PD RDT (Access Bio Inc.) (Figure 13) (67). Ils possèdent une sensibilité similaire au FST avec des caractéristiques opérationnelles supérieures. Le BinaxNOW[®] permet d'identifier les sujets présentant une activité enzymatique < 4 U/gHb. Il doit être réalisé à une température comprise entre 18 et 25°C et nécessite une chaîne du froid pour les réactifs, ce qui représente ses limites majeures d'utilisation (68). Le CareStart[®] a quant à lui un seuil de détection évalué à 2,7 U/gHb (69).



Figure 13: Tests qualitatifs de dépistage du déficit enzymatique en G6PD actuellement sur le marché pour les zones d'endémie palustre afin de guider le traitement par primaquine.

L'OMS a défini des seuils afin de classer les sujets selon leur activité enzymatique par rapport à l'activité normale (Tableau 3) (70) :

Tableau 3 : Seuils de classification des sujets déficitaires en G6 PD en fonction de leur activité enzymatique (70)

Male	
G6PD deficient	G6PD activity < 30% of the adjusted male median
G6PD normal	G6PD activity > 30% of the adjusted male median
Female	
G6PD deficient	G6PD activity < 30% of the adjusted male median
G6PD intermediate	G6PD activity 30-80% of the adjusted male median
G6PD normal	G6PD activity > 80% of the adjusted male median

Tous ces tests qualitatifs ont un seuil de détection aux alentours de 30% de l'activité enzymatique normale. Ils permettent la détection des sujets déficitaires hommes hémizygotés et femmes homozygotés mais ne permettant pas la détection des femmes hétérozygotés ayant une activité enzymatique comprise entre 30% et 70% de la normale (10), (68), (71).

Ce seuil de 30% est considéré comme suffisant pour guider le traitement par primaquine (72), bien que les femmes hétérozygotes semblent tout de même être exposées à un risque non négligeable d'hémolyse induite par le médicament (73) .

Le développement d'une technique quantitative fiable et utilisable dans les zones à faible ressource apparaît comme une priorité dans la stratégie de contrôle et d'élimination du paludisme.

b) Tests quantitatifs

1- Spectrophotométrie UV

La spectrophotométrie UV mesure la formation de NADPH provenant de l'activité enzymatique de la G6PD en mesurant la variation d'absorbance dans le temps de l'échantillon à 340 nm. Cette variation d'absorbance est directement proportionnelle à l'activité de la G6PD.

Le NAD⁺ et le NADPH absorbent tous deux dans l'ultraviolet, à des longueurs d'onde différentes. Le pic d'absorption de NAD⁺ s'observe à 260 nm alors que le NADPH absorbe l'ultraviolet à plus grande longueur d'onde, avec un second pic d'absorption à 340 nm (Figure 14).

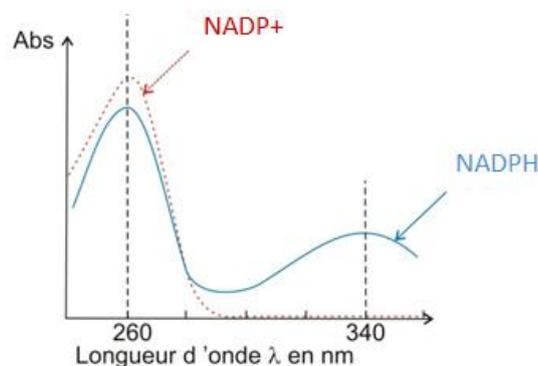


Figure 14 : Spectres d'absorption du NADP⁺/NADPH en fonction de la longueur d'onde

En se plaçant à 340nm, la variation de densité optique (DO) ne dépend donc que de l'apparition de NADPH.

Une mesure de DO initiale à 340nm est effectuée à t₀ sur le mélange réactionnel avant déclenchement de la réaction. Une deuxième mesure est effectuée après déclenchement de

la réaction. La variation de DO obtenue permet de calculer l'activité enzymatique de la G6PD.

Définition de l'activité enzymatique G6PD : (61)

Une unité internationale (U) est la quantité de G6PD nécessaire pour convertir 1 μmol de NADP⁺ par minute dans des conditions de réactions prédéterminées. L'activité enzymatique peut être exprimée soit par rapport à un nombre standard de cellules (U/10¹² érythrocytes), soit par rapport au taux d'hémoglobine (U/gHb). L'activité est mesurée sur un hémolysât des globules rouges provenant d'un échantillon sanguin.

Le déficit en G6PD est défini comme une activité enzymatique en G6PD inférieur à la normale dans un échantillon.

Cette méthode nécessite un spectrophotomètre à température et cinétique contrôlées, ainsi qu'un personnel de laboratoire habilité. L'inclusion d'au moins un contrôle positif (déficientaire en G6PD) et un négatif (G6PD normal) par série est hautement désirable.

2- Inhibition par le Chromate

Certains laboratoires utilisent un test basé sur l'effet inhibiteur du chromate sur la glutathione réductase. Le chromate provoque l'inactivation de la glutathione réductase par oxydation des groupes SH uniquement en présence de NADPH (74). Les globules rouges déficitaires en G6PD produisant moins de NADPH, l'effet inhibiteur du chromate n'est visible que chez les patients non déficitaires. La perte d'inhibition de l'activité de la glutathione réductase permet de mesurer la quantité de globules rouges déficitaires en G6PD (75).

La sensibilité de cette technique pour la détection des femmes hétérozygotes est meilleure que la détection de l'activité enzymatique globale de la G6PD. Elle ne permet cependant pas de détecter les femmes hétérozygotes ne possédant qu'une faible population de globules rouges déficitaires (75).

3- Technique cytofluorométrique

Cette technique dérive du test colorimétrique de la réduction de la méthémoglobine. Une première étape consiste à oxyder toute l'oxyhémoglobine (oxy-Hb, Fe²⁺) contenue dans les globules rouges en méthémoglobine (met-Hb, Fe³⁺) par ajout de nitrite.

L'ajout secondaire de glucose et d'un catalyseur (le Nile blue sulfate) va engendrer la réduction de la met-Hb en oxy-Hb par une enzyme érythrocytaire dépendante du NADPH (la NADPH-hémoprotéine réductase). Les globules rouges déficitaires en G6PD produisant peu de NADPH, ne seront donc pas capables de réduire la met-Hb (76).

La technique cytofluorométrique consiste à ajouter une troisième étape, en rajoutant du cyanure (réagissant uniquement avec la met-Hb pour former la cyanmethémoglobine, cyanmet-Hb) puis du peroxyde. Ce dernier réagit spécifiquement avec l'oxy-Hb pour former un composé fluorescent, la ferrylhémoglobine (ferryl-Hb), alors que la cyanmet-Hb reste non réactive et donc non fluorescente. Les globules rouges non déficitaires en G6PD, contenant beaucoup de ferryl-Hb, apparaîtront fluorescent alors que les globules rouges déficitaires en G6PD, contenant majoritairement de la cyanmet-Hb, resteront peu fluorescents (Figure 15) (76).

Il est donc possible avec cette technique de détecter facilement les patients hétérozygotes pour le déficit en G6PD par présence de deux pics de fluorescence (Figure 15 et 16) (76).

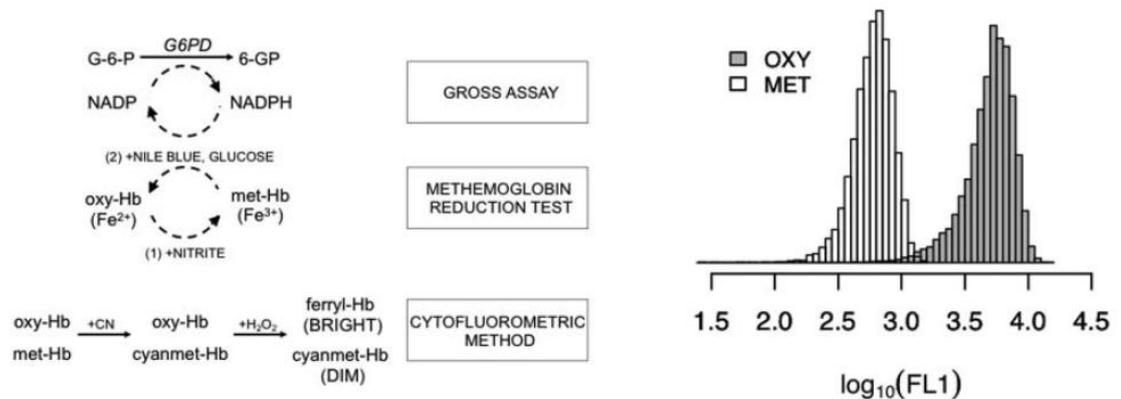


Figure 15 : Principe de la méthode cytofluorométrique.

La méthode cytofluorométrique est une extension fluorométrique de la technique de réduction de la méthémoglobine. La distribution de l'intensité de fluorescence (FL1, à droite) montre que la réaction séquentielle du cyanure puis du peroxyde sur les globules rouges contenant principalement de l'oxyhémoglobine donne un produit fluorescent (en gris), alors que les globules rouges contenant majoritairement de la méthémoglobine ne produisent que peu de fluorescence (en blanc) (76)

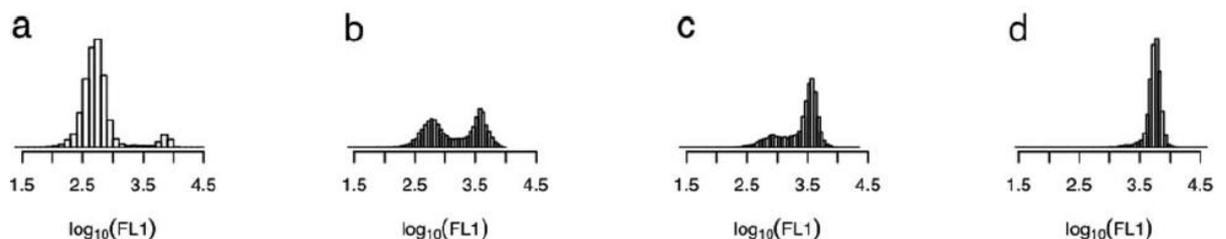


Figure 16 : Démonstration de la méthode cytofluorométrique sur des mélanges artificiels de variants A+ non déficitaire et A-déficitaire en G6PD. La distribution de l'intensité de fluorescence (FLI) de mélanges artificiels contenant chacun (a) 100%, (b) 50%, (c) 25% ou (d) 0% de variant A- (76)

c) Limites des tests qualitatifs et quantitatifs

L'activité enzymatique en G6PD peut être faussement augmentée lors d'une phase d'hémolyse aigue ou en présence d'un taux élevé de réticulocytes.

En effet, le niveau d'activité enzymatique des érythrocytes jeunes est plus élevé que chez les érythrocytes matures. Lors d'un épisode d'hémolyse aigue, les globules rouges avec l'activité enzymatique en G6PD la plus faible seront les premiers détruits, les érythrocytes les plus jeunes et les réticulocytes seront donc majoritaires dans le sang, pouvant entraîner une surestimation des résultats et donc des résultats faussement négatifs. Ceci est particulièrement vrai dans le cas des déficits modérés, de classe III selon l'OMS, auquel appartient le variant A- (77).

Il est donc recommandé dans ces situations de confirmer le dosage sur un nouveau prélèvement à distance de la crise réticulocytaire, ou bien d'entreprendre une enquête familiale.

Les mêmes difficultés diagnostiques peuvent être rencontrées chez les nouveau-nés, possédant une jeune population érythrocytaire.

Chez les sujets présentant une diminution de la quantité d'hémoglobine par globule rouge (hypochromie), observée dans la thalassémie et la carence martiale, l'activité enzymatique peut être artificiellement augmentée et le déficit peut être masqué en particulier chez une femme hétérozygote (78).

Une étude comparant les trois techniques quantitatives pour la détection des femmes hétérozygotes montre une meilleure sensibilité avec les techniques d'inhibition par le chromate et de cytofluorimétrie par rapport à la spectrophotométrie (respectivement 0,96 (IC95%: 0,71-1), 0,85 (IC95%: 0,66-0,96) et 0,52 (IC95%: 0,32-0,71)).

Les femmes hétérozygotes avec une part importante de globules rouges non déficitaires ne sont, la plupart du temps, pas détectées par les méthodes de routine mesurant l'activité enzymatique totale de la G6PD (75).

3) Diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire des déficits en G6PD est rarement effectué en première intention car le dosage enzymatique permet le diagnostic dans la majorité des cas. Cependant la recherche des mutations peut se justifier dans certains cas [1]. Cette dernière ciblera en 1^{ère} intention des mutations suspectées en fonction de l'origine géographique du patient. En 2^{ème} intention un séquençage complet du gène peut également être réalisé [1]. Un screening par HRM (High Resolution Melt) est le plus souvent réalisé en premier lieu. Le principe global des techniques de 1^{ère} intention consiste à amplifier la séquence du gène contenant la mutation suspectée, puis d'analyser les produits d'amplification en utilisant les

sites de restriction naturels ou ceux créés par la technique utilisant des oligonucléotides modifiés , ou par hybridation de sondes d'oligonucléotides spécifiques d'allèles mutés (77).

La technique HRM, ou analyse des courbes de fusion à haute résolution, permet la détection de mutations ou de polymorphisme génétique sur des échantillons d'ADN double brin.

La technique comporte différentes étapes :

1) Amplification de la région d'ADN d'intérêt par PCR

2) Chauffage très progressif de l'amplicon obtenu de 55°C à 95°C afin d'obtenir un temps de dissociation de l'ADN, correspondant au moment de séparation des deux brins d'ADN.

Le principe de la HRM est d'observer cette dissociation en temps réel, grâce à des colorants intercalant de l'ADN ayant la propriété d'avoir une fluorescence augmentée lorsqu'ils sont fixés à de l'ADN double brin. La fluorescence est donc maximale au début de l'analyse, à basse température, lorsque l'ADN est sous forme double brin, puis diminue au fur et à mesure que les brins d'ADN se séparent. On obtient une courbe de fusion pour chaque amplification, qui sera comparée à des courbes de patient non déficitaires et porteurs du variant correspondant à l'exon amplifié.

Un changement, même mineur, dans la séquence d'ADN conduit à une variation de la cinétique de fusion, pouvant être détectée grâce à la haute résolution utilisée.

Chaque sujet possédant normalement deux copies du gène, les deux allèles étant amplifiés simultanément, 3 courbes sont possibles (Figure 17) :

- Aucun allèle ne contient la mutation recherché (Wild Type, WT)
- Un allèle contient la mutation (sujet hétérozygote)
- Les deux allèles contiennent la mutation (homozygote)

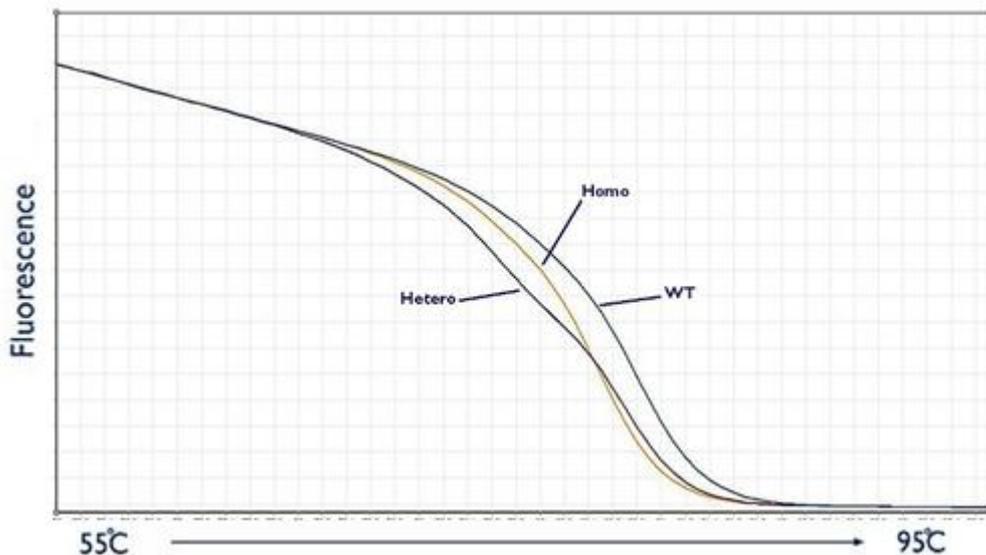


Figure 17: Exemple de courbes de fusion pouvant être observés par technique HRM selon le statut du patient

Les femmes homozygotes auront ainsi le même profil que les hommes hémizygotés, ces derniers ne possédant qu'une seule copie du gène.

A noter qu'il n'est pas possible avec cette technique de différencier un profil de femme homozygote de celui d'une femme hémizygotée (ayant un allèle muté et un allèle délété).

L'étude moléculaire est indiquée dans tous les déficits de classe I, permettant d'affirmer le diagnostic d'anémie hémolytique chronique non sphérocytaire. Il est également indiqué lorsque le dosage enzymatique ne permet pas le diagnostic, chez le patient transfusé depuis moins de 3 mois, chez le sujet en période de crise hémolytique intense ou avec une forte réticulocytose ou enfin pour confirmer chez une femme son statut d'hétérozygote (1).

Il permet également de confirmer dans le cadre d'enquêtes familiales le statut de conductrice chez les sujets féminins, le dosage enzymatique étant généralement normal. Un autre avantage est de travailler directement sur des échantillons d'ADN, plus stables que l'enzyme dans le sang.

Enfin, elle est particulièrement adaptée à des applications telles que les enquêtes de population ou pour un éventuel diagnostic prénatal.

VI- Prise en charge et évolution

La stratégie de prise en charge du déficit en G6PD repose essentiellement sur la prévention des crises hémolytiques en évitant les stress oxydatifs tels que l'ingestion de fèves et la prise de certains médicaments.

Cette approche nécessite toutefois que le patient soit conscient de son déficit, que ce soit à la suite d'un épisode hémolytique antérieur ou d'un programme de dépistage.

1) Anémie hémolytique aigue (AHA)

La grande majorité des crises hémolytiques sont de courte durée et ne nécessitent pas de traitement particulier en dehors de l'arrêt de l'exposition à l'agent déclenchant. Dans de rares cas, habituellement chez les enfants, l'hémolyse aigue conduit à une anémie sévère et peut nécessiter la transfusion de globules rouges.

2) Ictère néonatal

L'ictère néonatal causé par le déficit en G6PD est pris en charge de la même façon que les ictères d'autres étiologies. Lorsque le taux de bilirubine non conjuguée approche ou dépasse 150 $\mu\text{mol/L}$, la photothérapie est utilisée pour prévenir les dommages cérébraux. L'exposition à la lumière bleue permet de convertir la bilirubine en produits de dégradation hydrosolubles éliminables par voie rénale. Lorsque le taux dépasse les 300 $\mu\text{mol/L}$, une exsanguino-transfusion sanguine peut être nécessaire afin d'épurer le sang circulant de la bilirubine (10).

3) Anémie hémolytique chronique non sphérocytaire (CNSHA)

Les patients atteints de CNSHA ont généralement une anémie chronique bien tolérée, ne nécessitant pas de support transfusionnel. Cependant, ces patients doivent être suivis régulièrement car un événement oxydatif intercurrent peut sévèrement aggraver le degré d'anémie.

Dans de très rares cas, la CNSHA nécessite des transfusions régulières, et un traitement chélateur du fer doit alors être administré en parallèle. La splénectomie peut être discutée dans ces cas-là, mais est inconstamment efficace. La cholécystectomie est indiquée en cas de calculs biliaires symptomatiques (1).

Une supplémentation en acide folique (vitamine B9) est recommandée car le risque de carence est plus important chez les sujets déficitaires que dans la population générale, sous la forme d'un apport de 5 à 10 mg/jour de façon systématique et intermittente (1 à 2 semaines par mois) en cas d'hémolyse chronique, de grossesse programmée ou en cours, ou dans les suites d'un épisode infectieux (1).

Une supplémentation en vitamine E peut être proposée chez tous les patients déficitaires. Elle agit en tant qu'antioxydant à l'intérieur de la membrane cellulaire et empêche la destruction prématurée des globules rouges déficitaires en G6PD (79). Des études ont montrées que la prise de vitamine E au long cours à la dose de 800UI/jour (400UI/jour pour les enfants de moins de 12 ans) augmenterait significativement la durée de vie des globules rouges et le taux d'hémoglobine, et diminuerait le taux de réticulocytes et de bilirubine (79), (80).

4) Prévention et éducation

L'éviction des médicaments oxydants ainsi que les fèves chez les individus déficitaires permet d'éviter facilement les crises hémolytiques aiguës. Une liste de médicaments susceptibles de provoquer une hémolyse chez les patients atteints de déficit en G6PD a été publiée par l'ANSM et actualisée en 2014 (81) (Annexe I). Cette liste est établie à partir des données de la littérature et de pharmacovigilance. Elle fait actuellement référence et doit être remise à tout patient déficitaire. Elle établit trois niveaux de précautions en séparant les médicaments contre-indiqués, les médicaments déconseillés et les médicaments dont la dose maximale doit être respectée.

Il est important de noter qu'il existe de grandes variations de sensibilité entre les patients en raison notamment du nombre important de polymorphismes (ou variants). Ainsi, certains sujets porteurs du déficit en G6PD vont présenter une hémolyse avec un médicament donné, alors que d'autres toléreront bien ce même médicament. D'un point de vue pratique, s'il faut donc contre-indiquer les médicaments qui peuvent entraîner une hémolyse chez la plupart des sujets porteurs du déficit, il convient d'être plus prudent quant à l'éviction de médicaments dont une hémolyse a pu être décrite dans la littérature mais sans relation causale établie.

Concernant les aliments, hormis les fèves, tous les autres fruits et légumes sont autorisés chez les sujets déficitaires en G6PD. Seuls les apports élevés de vitamine C par le biais de compléments alimentaires sont à éviter afin de ne pas dépasser la dose de 1 g/jour. La quinine, contenue dans certaines boissons toniques, énergisantes ou apéritives, peut provoquer des hémolyses aiguës et est à proscrire.

La liste simplifiée et complète des médicaments et aliments est disponible sur le site Vigifavisme (Association française des personnes atteintes de déficit en G6PD, lien internet : <http://www.vigifavisme.com/>).

Ces mesures doivent être appliquées tout au long de la vie du patient déficitaire en G6PD, quels que soient ses antécédents et le type de mutation dont il est atteint. Elles doivent également être suivies par les femmes enceintes ou allaitantes de nouveau-nés potentiellement déficients.

Chaque patient déficitaire doit faire établir sa carte de soins et d'urgence pour le déficit en G6PD, carte disponible sur demande du médecin traitant ou spécialiste. Celle-ci est fournie avec un livret d'informations et conseils sur la pathologie (Figure 18).

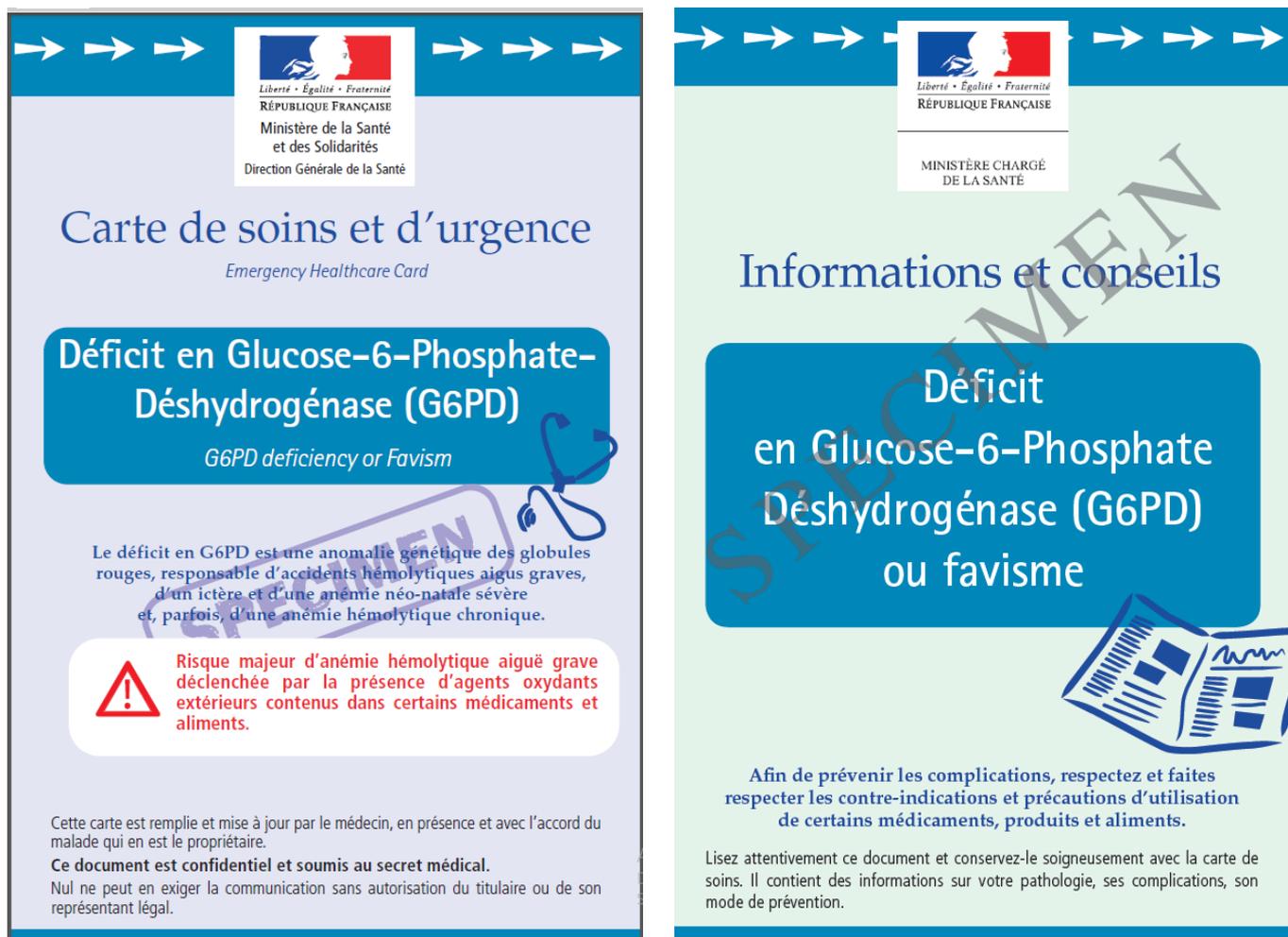


Figure 18 : Documents établis pour chaque patient déficitaire en G6PD, comprenant une carte de soins et d'urgence et un livret d'informations et conseils sur la pathologie.

Chez les femmes hétérozygotes, le risque d'hémolyse dépend en partie de la valeur de l'activité enzymatique et de l'importance de l'exposition chimique en cause. En cas d'activité très basse, les mêmes précautions établies pour les hommes hémizygotés et les femmes homozygotes sont préconisées. Si l'activité enzymatique est normale, les précautions particulières ne sont pas obligatoires sauf en cas de grossesse ou d'allaitement (1).

En règle générale, les sujets déficitaires ont une bonne espérance de vie et peuvent mener une vie normale en suivant ces recommandations.

La recherche du déficit en G6PD, bien que non réalisée en France en routine chez les nouveau-nés, semble pertinente devant toute hyperbilirubinémie dans les premiers jours de vie ou dans le cadre d'antécédent d'ictère néonatal dans la fratrie.

Certains pays du Moyen-Orient, de l'Europe de l'est ou d'Asie du Sud-est ont choisi d'intégrer le dépistage du déficit en G6PD à leur programme de dépistage néonatal (15), (82). A Singapour, ce dépistage de masse a été instauré en 1965. Depuis, le nombre d'ictère nucléaire a diminué drastiquement, et aucun cas d'ictère nucléaire provoqué par un déficit en G6PD n'a été décrit depuis plus de 20 ans (83).

B) VALIDATION ET VERIFICATION DE METHODES

I- Contexte législatif

Suite à l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale et dans le cadre de l'accréditation des laboratoires exigée selon la norme NF EN ISO 15189, toute méthode de dosage utilisée au laboratoire de biologie médicale (LBM) doit bénéficier avant sa mise en place en routine d'une validation ou d'une vérification de méthode afin de garantir la fiabilité des résultats rendus.

1) Définition d'une validation/vérification de méthode

Une validation de méthode correspond à la « confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites » (portée flexible étendue B) ;

Une vérification de méthode correspond à la « confirmation par des preuves tangibles que les exigences spécifiées ont été satisfaites » (portée flexible standard A) (84).

Pour la plupart des analyses réalisées par les LBM, une vérification de méthode est suffisante. En effet, les LBM adoptent majoritairement des méthodes reconnues ou normalisées qui sont considérées comme validées (DM-DIV marqué CE ou méthodes « fournisseur » utilisées dans leur domaine d'application). Il s'agit de s'assurer que les performances attendues par le laboratoire et annoncées par le fournisseur sont atteintes.

2) Analyses quantitatives/qualitatives

Il est nécessaire de distinguer deux types de méthodes pour le dossier de validation/vérification de méthode :

- Les méthodes quantitatives : elles fournissent des résultats issus de données numériques
- Les méthodes qualitatives : elles fournissent des résultats issus de données non numériques (par exemple les résultats binaires : présence/absence, positif/négatif...)

Les résultats de méthodes assimilées comme semi-quantitatives ou semi-qualitatives sont à considérer comme étant des méthodes quantitatives (85).

Les paramètres à étudier pour la validation ou vérification de méthode vont différer selon si la méthode est quantitative ou qualitative (85) (Tableau 4).

Tableau 4 : Résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative (85)

Critères à évaluer	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	Essai	Essai
Justesse/exactitude (approche)	Essai	Essai	Essai	Essai
Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire et analyses des discordances	Essai	Essai	Essai	Essai
Intervalle de mesure (limite de quantification et limites de linéarité)	Bibliographie	-	Essai	Essai
Interférences	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Robustesse	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Stabilité réactifs	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Intervalle de référence (valeurs usuelles)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Limite de détection	-	Bibliographie	-	Essai
Spécificité/sensibilité analytique	-	Bibliographie	-	Essai

3) Définition des besoins du laboratoire

L'objectif d'une vérification de méthode est de déclarer l'aptitude du processus analytique par rapport à des limites acceptables ou spécifications que le laboratoire s'est préalablement fixé. Le choix des limites acceptables doit donc se faire préalablement à la vérification de méthode, et doit se baser sur les besoins des patients et/ou des prescripteurs.

Les limites d'acceptabilité peuvent reposer sur différentes approches :

- l'intervalle des valeurs de référence (prend en compte la variation biologique interindividuelle et la variation analytique)

- les variations biologiques interindividuelles et intra-individuelles
- les besoins des cliniciens
- l'état de l'art (établi à partir des résultats des CQI et/ou des CQE)

Le LBM pourra également s'appuyer sur des recommandations fournies par la HAS ou des textes réglementaires, et sur des critères de performances annoncées par les sociétés savantes. Le choix sera confronté aux données du fournisseur.

4) Vérification continue des performances de la méthode

Une fois la méthode mise en place en routine, le laboratoire doit garantir la qualité des résultats rendus (paragraphe 5.6 de la norme NF EN ISO 15189 (86)), et doit pour cela concevoir des procédures de contrôle de qualité. Le SH GTA 06 est un guide pratique d'aide à la mise en place de ces contrôles (87).

Le contrôle de qualité constitue un moyen de vérification de la maîtrise en continue du processus analytique. L'objectif est d'apporter une confirmation et une preuve permanente de la validité des résultats rendus.

Il existe différents types de contrôle de qualité :

- **Contrôle interne de qualité (CQI) :** réalisé au sein du laboratoire à l'aide d'échantillons de contrôle lors de la mesure d'échantillons biologiques de patients afin de vérifier la maîtrise du processus analytique. L'interprétation se fera en fonction de limites de tolérance déterminées selon un protocole préétabli.
- **Comparaison interlaboratoire (CIL) :** consiste à organiser, exécuter et évaluer des mesures sur la même entité ou sur des entités similaires par deux laboratoires ou plus dans des conditions prédéterminées.
 - **Evaluation externe de la qualité (EEQ) :** Procédure d'évaluation des performances d'un laboratoire par le biais d'une comparaison interlaboratoires réalisée par un organisateur, à l'aide d'échantillon de contrôles inconnus.
 - **Contrôle interne de qualité externalisé :** CQI réalisé par plusieurs laboratoires sur un même lot d'échantillons de contrôles confrontés entre eux périodiquement.

II- Etapes de la vérification de méthode

Le LBM doit s'appuyer sur une procédure de vérification de méthode, réaliser les différentes étapes et formaliser les résultats dans un enregistrement nommé « dossier de vérification de méthode ». Un dossier doit être réalisé pour chacun des paramètres mesurés par le laboratoire.

Pour la rédaction d'un dossier de vérification de méthode, des formulaires-types ont été proposés par le Cofrac. Celui s'appliquant pour les méthodes de type quantitatif est le SH FORM 43 (88).

1) Description de la méthode

Elle représente la première partie du dossier de vérification de la méthode. Elle décrit les informations concernant le système analytique (méthode/équipement/réactif), mais aussi les étapes préanalytiques nécessaires avant la réalisation de l'analyse à proprement parler.

2) Evaluation des performances de la méthode

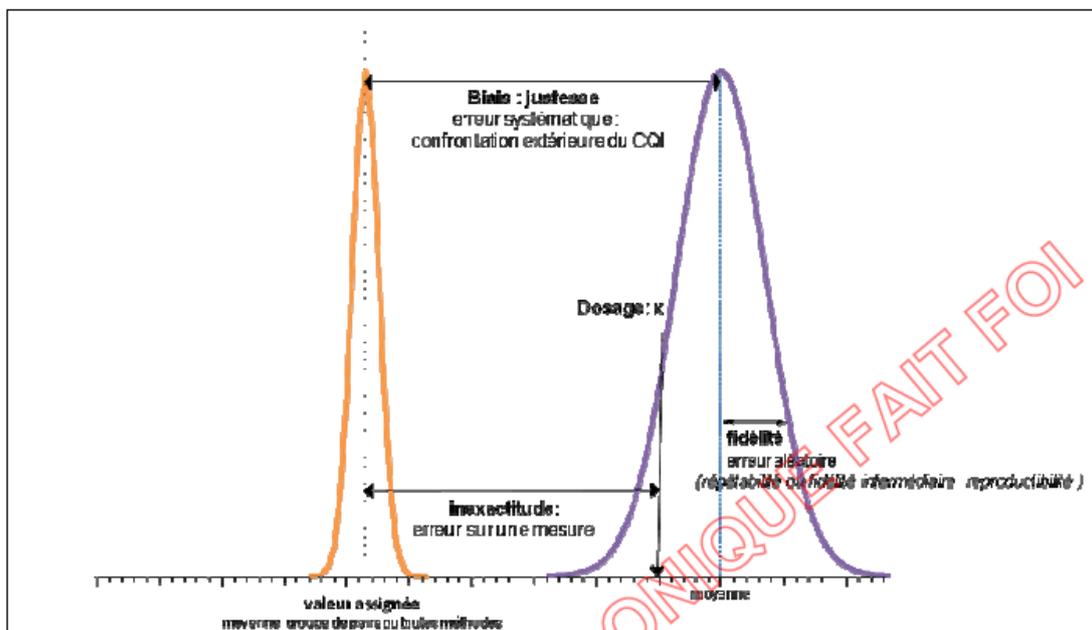


Figure 19 : Représentation schématique des performances évaluées lors d'une vérification/validation de méthode (87)

a) Fidélité

La fidélité représente l'étroitesse de l'accord entre les valeurs obtenues par des mesures répétées du même échantillon dans des conditions spécifiées (Figure 19). Elle caractérise donc la dispersion des résultats, sans relation avec la valeur vraie. Elle est estimée par la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

1- Répétabilité

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans un intervalle le temps le plus court possible et dans des conditions strictement identiques (même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage). L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné (85).

Cette mesure doit être effectuée sur plusieurs niveaux (au moins 2), le plus proche possible des seuils décisionnels.

2- Fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire

L'essai de fidélité intermédiaire consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier différents paramètres (opérateurs, conditions ambiantes, lots de réactifs...) (85).

Les niveaux testés pour évaluer la fidélité intermédiaire doivent être les mêmes que ceux testés pour la répétabilité.

b) Justesse et Exactitude

La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence (ou valeur vraie) (Figure 19) (87).

Une approche de la justesse est d'évaluer le biais de la méthode (également appelé erreur de justesse ou erreur systématique). Ce biais correspond à l'écart observé entre la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon et la valeur de référence.

Le biais est évalué à l'aide de l'externalisation des CQI, programme de comparaison inter-laboratoire des résultats de CQI obtenus suivant la méthode de dosage.

Dans le cas où l'évaluation de la justesse n'est pas possible, une évaluation de l'exactitude pourra être effectuée.

L'exactitude de mesure correspond à l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie d'un mesurande [87].

L'étude de l'exactitude (ou inexactitude) consiste à comparer le résultat d'un seul dosage d'un échantillon inconnu à une valeur cible consensuelle (Figure 19).

Elle est calculée à partir des résultats des Contrôles Externes de Qualité (CQE) ponctuels, où la moyenne des résultats du groupe de pairs représente la valeur cible consensuelle, et représente le biais de notre méthode par rapport au groupe de pairs.

c) Incertitude de mesure

1- Principe

Le laboratoire doit déterminer l'incertitude des résultats, dans les cas où cela est pertinent et possible. Toutes les composantes importantes de l'incertitude doivent être prises en compte (86).

Pour la détermination de l'incertitude de mesure des résultats, les LBM peuvent s'aider du document SH GTA 14 (89).

L'incertitude de mesure est un paramètre caractérisant la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, c'est donc un indicateur de la qualité d'un résultat et de la fiabilité qu'on peut lui accorder.

La connaissance de l'incertitude constitue une aide pour le clinicien dans sa prise de décision diagnostique ou thérapeutique, et apporte au biologiste médical un élément important pour l'interprétation d'un résultat.

Le laboratoire doit analyser le processus de mesure en réalisant tout d'abord deux étapes :

-Définir le mesurande : définir ce que l'on veut mesurer dans le contexte de la biologie médicale avec le maximum d'informations ayant un impact sur la mesure.

-Analyser le processus de mesure : Analyser les phases préanalytiques et analytiques du processus de mesure afin d'identifier les facteurs d'influence susceptibles d'introduire une variation sur le résultat. L'objectif est de connaître les risques de la méthode pour pouvoir agir en conséquence et donc optimiser la fiabilité des résultats rendus.

2- Analyse de risque

Le diagramme des 5M ou diagramme d'Ishikawa (Figure 20) peut être utilisé pour analyser le processus afin d'identifier les facteurs de risques susceptibles d'influencer le résultat.

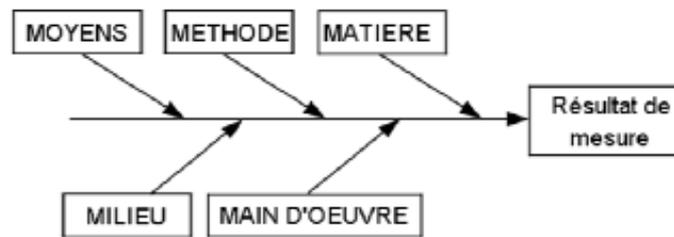


Figure 20 : Diagramme des 5 M pour l'élaboration de la maîtrise des risques (d'après (89))

3- Estimation mathématique de l'incertitude de mesure

Pour les méthodes qualitatives, une analyse de risque est suffisante pour l'évaluation de l'incertitude de mesure.

Pour les méthodes quantitatives, une détermination mathématique de l'incertitude de mesure doit être effectuée en plus de l'analyse de risque.

Celle-ci peut être effectuée selon la méthode « CIQ/EEQ », qui repose sur l'exploitation des données issues des CIQ et des EEQ (89).

Calcul de l'incertitude-type de mesure $u(C)$ (%) :

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$$

Avec :

- $u^2(CIQ)$: variance de l'ensemble des résultats du CIQ, liée à la fidélité intermédiaire

$$u^2(CIQ) = \left(\frac{CV \text{ du CIQ} \times \text{moyenne du CIQ}}{100} \right)^2$$

- $u^2(EEQ)$: variance liée à la justesse (biais), à partir des résultats des EEQ :

$$u^2(EEQ) = \left(\sqrt{\left(\frac{|E|}{\sqrt{3}} \right)^2 + \hat{\sigma}_E^2} \right)^2$$

$$\text{Avec } \bar{E} = \frac{\sum_i (x_{lab} - x_{ref})_i}{n} \text{ et } \hat{\sigma}_E = \sqrt{\frac{\sum_i (E_i - \bar{E})^2}{n-1}}$$

E : écart entre le résultat du laboratoire et la valeur cible

X_{lab} : résultat du laboratoire à l'EEQ

X_{ref} : valeur cible

n : nombre de valeurs d'EEQ

$\hat{\sigma}_E$: écart-type des écarts entre le résultat du laboratoire et la valeur cible

Expression du résultat de l'analyse :

Dans la pratique, on ne peut réaliser qu'un nombre limité de mesurage. Pour prendre en compte cette limite, on applique un facteur k à l'incertitude-type, appelé facteur d'élargissement.

Pour un intervalle de confiance de 95%, k = 2, d'où incertitude élargie U(c) :

$$U(C) = 2 \times u(C)$$

d) Comparaison de méthodes

Le laboratoire doit comparer les résultats de sa méthode en cours de vérification, soit à la méthode précédemment utilisée, soit à la méthode de référence. Il doit alors évaluer l'impact des discordances éventuelles (85).

e) Etendue de mesure

La limite de détection représente la plus petite valeur de mesurande pouvant être détectée par une procédure analytique avec un niveau de confiance spécifié, autrement appelée « concentration détectable minimale » (85).

La limite de quantification est la plus petite valeur de mesurande pouvant être quantifiée, avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

f) Interférences

Une méthode « sélective » permet le dosage d'un analyte dans une matrice complexe sans interférence. Certaines substances dites « interférentes » altèrent le signal de mesure et peuvent entraîner des résultats erronés, par exemple l'hémolyse, la turbidité, l'ictère ou encore certains médicaments.

Le laboratoire doit effectuer une étude expérimentale dans le cas d'une méthode de portée B afin d'établir l'influence de ces substances présentes dans la matrice sur les résultats (85).

g) Intervalles de références

L'intervalle de référence et les seuils de décision médicale doivent être définis et documentés par le laboratoire, en fonction de l'âge, du sexe... et devront être adaptés à l'usage des résultats par les cliniciens en pratique courante (85).

L'établissement d'intervalles de référence par le laboratoire est indispensable pour les validations de méthode de portée B, mais peut être pertinente dans certaines vérifications de méthodes de portée A.

PARTIE 2 : TRAVAUX PERSONNELS

I- Contexte, hypothèse et objectifs

Le CHU de Pellegrin est membre de la filière de santé maladies rares MCGRE (Maladies Constitutionnelles Rares du Globule Rouge et de l'Erythropoïèse) en tant que centre de compétence. Cette filière de santé a été créée en 2014 et a pour vocation d'améliorer la prise en charge des patients atteints de maladies rares du globule rouge (dont fait partie le déficit en G6PD), d'harmoniser les pratiques professionnelles et de développer l'information et les échanges. Elle est organisée autour de 2 centres de référence, 13 sites constitutifs, 46 centres de compétence, des laboratoires de diagnostic approfondis et les associations de patients, et est présente sur l'ensemble du territoire national métropolitain et DOM-TOM.

Parmi les patients de la file active du centre de compétence de Bordeaux, 33 patients déficitaires en G6PD ont été diagnostiqués et vus en consultation en 2016.

Au CHU de Pellegrin, les principales indications du dosage de l'activité enzymatique de la G6PD sont les suivantes :

- ictère néonatal sévère et/ou prolongé
- anémie hémolytique aiguë (après ingestion de fèves, exposition à un médicament oxydant, infection...)
- anémie hémolytique chronique
- élimination d'un déficit avant la prescription de médicaments contre-indiqués en cas de déficit en G6PD (liste de l'ANSM en annexe I)
- bilan systématique de primo-arrivant en France
- bilan systématique du patient drépanocytaire ou porteur d'une autre hémoglobinopathie
- Enquête familiale d'un cas index

Au laboratoire d'hématologie du CHU de Pellegrin, la technique de dosage de l'activité enzymatique de la G6PD était réalisée jusqu'alors par spectrophotométrie UV avec les réactifs Trinity.

Un nouvel appel d'offre nous a amené à reconsidérer le fournisseur de réactifs.

Parmi les fournisseurs avec marquage CE offrant la possibilité d'élargir notre panel de dosage enzymatique érythrocytaire, la société Biosentec était un bon candidat.

Avant d'envisager un changement de fournisseur de réactifs et conformément aux exigences actuelles en termes de qualité dans les laboratoires de biologie médicale énoncées par le

Cofrac (Comité français d'accréditation) et la norme NF EN ISO 15189, la réalisation d'une vérification de méthode des réactifs de ce nouveau fournisseur est indispensable.

Les résultats du dosage enzymatique érythrocytaire de la G6PD avec les réactifs Biosentec étant exprimés de façon numérique en U/gHb, il s'agit donc d'une méthode quantitative, de portée A, dont les principaux critères à vérifier sont la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire), la justesse et l'exactitude, l'incertitude de mesure et la comparaison avec la méthode précédente.

En complément de cette vérification de méthode, nous avons réalisé une analyse de risque, et proposons une grille de formation et d'habilitation pour le personnel technique.

Enfin, une présentation des résultats des dosages enzymatiques obtenus sur une période donnée et une confrontation de certains dosages aux résultats des analyses génétiques sont présentées.

II- Matériels et méthodes

1) Principe du dosage

Le dosage de l'activité enzymatique érythrocytaire de la G6PD s'effectue par technique spectrophotométrique UV à 340 nm pour les 2 fournisseurs (Trinity et Biosentec).

La G6PD catalyse la 1^{ère} étape de la voie des pentoses phosphates par oxydation du glucose-6-phosphate (G6P) en 6-phosphogluconolactone (6PG) associée à la réduction du NADP en NADPH.



La quantité de NADPH formée par unité de temps est proportionnelle à l'activité de la G6PD présente dans l'échantillon.

a) Technique Biosentec

La préparation du mélange réactionnel est réalisée dans des cuvettes de spectrophotométrie thermostatées à 37°C et contient initialement 1mL de tampon à pH 8,6, 200 µL de NADP, 600 µL d'eau physiologique et 100 µL d'hémolysât préparé à partir de l'échantillon sanguin du patient.

Après au moins 5 minutes d'incubation, une première mesure de densité optique (DO) initiale à 340 nm est effectuée.

La réaction est ensuite déclenchée par ajout de 100 µL de G6P, et une seconde mesure de DO finale est effectuée après 5 minutes précisément.

Une mesure de l'hémoglobine contenue dans l'hémolysât est réalisée en parallèle sur les appareils de cytologie DXH Beckman Coulter (BC) du laboratoire.

La variation de DO obtenue permet de calculer l'activité enzymatique de la G6PD selon les formules suivantes :

$$\text{Act. G6PD(U/mL)} = \frac{V}{\varepsilon * l * v} * \frac{\Delta DO}{\Delta t} = 0,643 * \Delta DO$$

$$\text{Act. G6PD(U/gHb)} = \frac{V}{\varepsilon * l * v} * \frac{\Delta DO}{\Delta t} * \frac{1}{Hb} * 100 = 964,6 * \frac{1}{Hb} * \Delta DO$$

Avec:

ΔDO = [DO finale – DO initiale] de l'échantillon

V = Volume total du mélange réactionnel (soit 2mL)

ε = Coefficient d'extinction molaire du NADPH (6.22 L.mmol⁻¹.cm⁻¹)

l = longueur du trajet optique (1 cm)

v = Volume d'échantillon (0,1mL)

Δt = Temps de l'analyse (5min)

Hb = taux d'hémoglobine de l'hémolysât (en g/dL)

Chaque série de dosages est encadrée par des CQI (niveau haut + niveau bas), nous permettant de valider les résultats des patients de la série si les résultats des CQI sont dans les bornes du fournisseur.

La valeur d'activité enzymatique obtenue est ensuite comparée aux valeurs usuelles fournies par le fournisseur :

Valeurs usuelles : 6-14 U/gHb à 37°C

b) Technique Trinity

Le mélange réactionnel est réalisé à température ambiante directement dans le flacon réactif fourni par le fournisseur, après ajout d'1mL d'eau distillée et de 10 µL de sang total du patient.

Après agitation par rotation et incubation de 5-10min, 2mL de substrat G6P sont ajoutés. Le mélange réactionnel est ensuite transvasé dans une cuve du spectrophotomètre thermostatée à 30°C.

Au bout de 5min, une première mesure de DO initiale est effectuée, puis une deuxième mesure de DO finale 5 min après la première.

Une mesure de l'hémoglobine sur sang total (NFS) est réalisée en parallèle sur les appareils de cytologie DXH BC du laboratoire.

La variation de DO obtenue permet de calculer l'activité enzymatique de la G6PD selon les formules suivantes :

$$\begin{aligned}\text{Act G6PD (U/ } 10^{12}\text{GR)} &= \frac{\Delta\text{DO}}{\Delta t} * \frac{V * \text{FCT}}{v * \epsilon * (\text{N} \times 10^6) * 1000} * 10^{12} \\ &= \frac{\Delta\text{DO} * \text{FCT} * 48\,390}{\text{N}}\end{aligned}$$

$$\text{Act G6PD (U/gHb)} = \frac{\Delta\text{DO}}{\Delta t} * \frac{100 * V * \text{FCT}}{v * \epsilon * \text{Hb}} = \frac{\Delta\text{DO} * \text{FCT} * 4839}{\text{Hb}}$$

Avec :

ΔDO = [DO finale – DO initiale] de l'échantillon

V = Volume total du mélange réactionnel (soit 3,01mL)

ϵ = Coefficient d'extinction molaire du NADPH (6.22 L.mmol⁻¹.cm⁻¹)

v = Volume d'échantillon (0,01mL)

Δt = Temps de l'analyse (5min)

Hb = taux d'hémoglobine (en g/dL)

FCT = Facteur de correction de température (indiqué dans la notice réactif si température différente de 30°C, sinon FCT = 1)

$\text{N} \times 10^6$ = Numération érythrocytaire (GR/mm³)

La valeur d'activité enzymatique obtenue est ensuite comparée aux valeurs usuelles fournies par le fournisseur :

Valeurs usuelles : 4,6 – 13,5 U/gHb à 30 °C

Le matériel utilisé lors la réalisation du dosage est le suivant :

- Instrument : Spectrophotomètre UVIKON XS (Réf. OM7717)
- Réactifs : G6PD Biosentec Réf. 64-17141
G6PD Trinity Réf. H020009
- CQI : G6PD Biosentec Réf. 116-17141
G6PD Trinity Réf. i-86-13 (contrôle normal) et i-85-27 (contrôle bas)

2) Préanalytique

Alors que le dosage enzymatique par technique Trinity s'effectue directement à partir de sang total issu de tube EDTA, le dosage enzymatique avec les réactifs Biosentec nécessite des prélèvements sur tube ACD (Acide Citrate Dextrose) de BD Vacutainer® et un traitement préanalytique.

Le prétraitement des tubes ACD consiste à préparer des culots globulaires permettant de ne garder que les globules rouges et d'éliminer les autres composants sanguins (plasma, leucocytes).

L'analyse est ensuite réalisée sur un hémolysât issu d'un des culots globulaires.

Ces différentes étapes préanalytiques sont réalisées au laboratoire en accord avec les recommandations fournisseurs (G6PD Biosentec Ref.64 Notice version v14421) (90).

a) Préparation des culots globulaires pour la technique Biosentec

La température doit être maintenue à +4°C tout au long de la procédure, celle-ci est donc réalisée dans un bac rempli de glace.

Dans un tube à hémolyse sont mélangés volume à volume le sang total du patient avec du NaCl 0,9%. Après une agitation douce (2-3 retournements), le mélange est centrifugé 5min à 3000 rpm (rotation par minute) à +4°C. Après avoir éliminé le surnageant ainsi que la couche leucocytaire à l'aide d'une pipette, 2 autres lavages successifs des globules rouges sont réalisés, la dernière centrifugation étant réalisée 10min à 3000 rpm à +4°C

Le culot globulaire est ensuite aliquoté en échantillons de 100µL dans des tubes eppendorf identifiés et conservés à -80°C. Généralement, 4 culots sont réalisés à partir du prélèvement primaire.

Un hémolysât est ensuite préparé à partir de ce culot globulaire le jour même de l'analyse, celle-ci étant réalisée par série au laboratoire, deux fois par semaine les mardis et jeudi sauf en cas d'urgence.

b) Préparation de l'hémolysât pour la technique Biosentec

L'ensemble des étapes est réalisée à +4°C.

Après décongélation lente à +4°C d'un culot globulaire, 1,4mL d'eau distillée sont ajoutés. Après avoir vortexé et centrifugé le mélange 5min à 5000 rpm, le surnageant est ensuite récupéré dans un tube à hémolyse pour mesure de l'hémoglobine et de l'activité enzymatique de la G6PD.

3) Evaluation des performances de la méthode

a) Fidélité

Les CQI du fournisseur Biosentec, échantillons lyophilisés, ont été utilisés afin de tester la répétabilité et la reproductibilité sur deux niveaux, un niveau avec une valeur cible fournisseur 0,113-0,153 U/mL nommé CQI bas et un niveau plus élevé correspondant à une activité enzymatique cible entre 0,421-0,569 U/mL nommé CQI haut.

Les CQI ne permettant pas d'évaluer la phase préanalytique, la fidélité a également été testée à partir d'échantillons patients.

1- Répétabilité

Chaque série ne pouvant comporter au maximum que 6 échantillons, chaque CQI a été passé 5 fois. La 6^{ème} position a été utilisée pour passer le CQI de l'autre niveau afin de valider la série.

La répétabilité a également été évaluée sur sang (Figure 21), à partir d'hémolysâts issus de deux patients, l'un ayant une activité enzymatique dans les valeurs hautes, et l'autre ayant une activité enzymatique proche du seuil de 6 U/gHb. Le dosage a été répété 10 fois pour chacun des 2 hémolysâts et les analyses ont été validées par passage de CQI encadrant les séries.

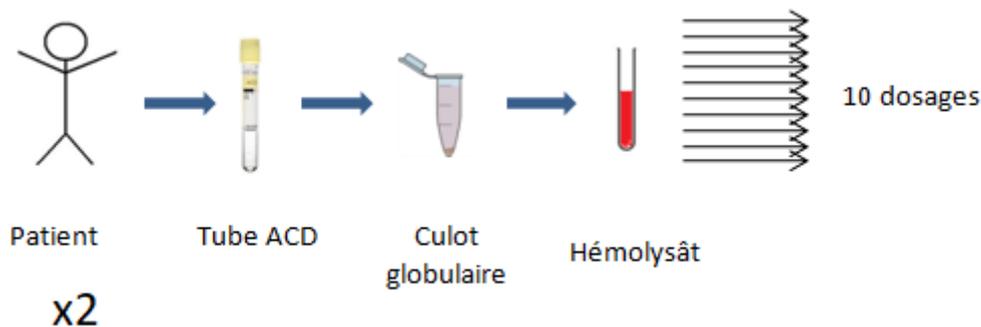


Figure 21 : Schéma représentatif de la répétabilité sur échantillon sanguin. La même manipulation a été réalisée sur deux patients différents, l'un possédant une activité enzymatique dans les valeurs hautes, l'autre proche du seuil de 6 U/gHb.

Pour chaque série de résultats, un coefficient de variation (CV) expérimental est calculé en fonction de la moyenne (m) et de l'écart-type (S), selon la formule suivante :

$$CV(\%) = \frac{S}{m} \times 100$$

Le CV limite admissible choisi, en terme d'objectif de résultat, est celui proposé par Ricos *et col.*, reposant sur l'étude des coefficients de variation intra et interindividuelles de chaque analyte. (91). Les tables de Ricos ont l'avantage d'être mises à jour régulièrement, et prennent donc en compte les nouvelles générations d'automate et les nouvelles méthodes d'analyse.

Nous nous sommes donc référés aux CV dits « souhaitable » et « minimal » selon Ricos *et col.* pour le dosage de la G6PD érythrocytaire (91), mise à jour en 2014, en utilisant les formules suivantes (92):

CV(%) de répétabilité « souhaitable » = $(1/1,33) \times 0,5 \times CVw$ soit 12,3

CV(%) de répétabilité « minimal » = $(1/1,33 \times 0,75 \times CVw)$ soit 18,5

Avec CVw : CV intra-individuel fourni par Ricos *et col.*, égal à 32,8% pour le dosage de la G6PD érythrocytaire.

Le CV souhaitable de Ricos a été choisi comme cible pour la répétabilité sur CQI et le CV minimal de Ricos pour la répétabilité sur sang en raison de facteurs de variation supplémentaires sur les échantillons sanguins, notamment préanalytiques.

2- Fidélité intermédiaire

L'évaluation de la fidélité intermédiaire a été effectuée en prenant les valeurs des CQI obtenues lors des différentes manipulations de la vérification de méthode puis celles des premières séries de patients entre le 24 juillet 2017 et le 10 octobre 2017, pour un total de 30 valeurs.

La fidélité intermédiaire a également été évaluée à partir d'échantillons sanguins (Figure 22), en analysant les 4 culots globulaires issus de 6 patients différents.

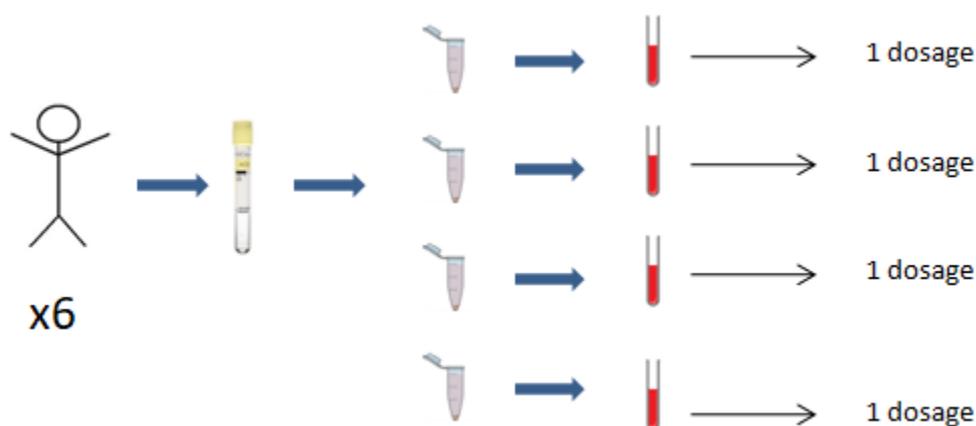


Figure 22: Schéma représentatif de la fidélité intermédiaire sur échantillon sanguin. La même manipulation a été réalisée sur six patients différents.

De la même façon que pour le calcul de la répétabilité, un CV expérimental a été calculé pour chaque série de résultat. Les CV obtenus ont été comparés au CV cible de reproductibilité de Ricos, calculé selon la formule suivante (93) :

CV (%) de reproductibilité = 1,33 x CV(%) de répétabilité

Soit **CV de reproductibilité « souhaitable » = 16,4**

Et **CV de reproductibilité « minimal » = 24 ,6**

Le CV souhaitable de Ricos a été choisi comme cible pour la fidélité intermédiaire sur CQI et le CV minimal de Ricos pour celle sur échantillons sanguins.

b) Exactitude et incertitude de mesure

Les CQE (UKNEQAS) ont été utilisés afin d'établir l'exactitude de nos résultats en se comparant à la moyenne de notre groupe de pairs (laboratoires utilisant la même technique et le même automate que le nôtre). Deux échantillons sanguins sont envoyés tous les deux mois, analysés au laboratoire, et les résultats obtenus transmis à l'organisateur. L'interprétation des résultats obtenus est basée sur le Z- Score (ou Deviation Index, DI) et le score de performance.

$$z - score = \frac{(x_{labo} - x_{groupe\ de\ pairs})}{S_{groupe\ de\ pairs}}$$

Avec x_{labo} : valeur obtenue par le laboratoire pour le CQE

$x_{groupe\ de\ pairs}$: moyenne des valeurs obtenues par le groupes de pairs

$S_{groupe\ de\ pairs}$: écart-type des valeurs obtenues par le groupe de pairs

Ce score doit être inférieur à 2 pour que la méthode soit jugée satisfaisante.

Le score de performance est calculé en faisant la somme de la valeur absolue des z-scores obtenus pour chaque échantillon de CQE, et en multipliant le résultat par un facteur (défini à 10 par le fournisseur pour le dosage de la G6PD).

A noter que toute valeur de z-score > 3,5 est tronquée de 3,5, et ce afin que les potentielles erreurs de retranscription de résultats n'impactent pas sur le calcul.

Ce score s'interprète sur les résultats de 6 échantillons au minimum et doit être inférieur ou égal à 100.

L'ensemble des campagnes de l'année 2018 (n=8) ont été prise en compte.

L'incertitude de mesure de la technique a été calculée selon la méthode CIQ/EEQ, détaillée précédemment (Partie 1-B, paragraphe II-2-c-2), en utilisant les variances obtenues à partir des résultats des 8 CQE de l'année 2018 et des résultats de la fidélité intermédiaire sur CQI.

Les CIQ sont réalisés sur échantillons non sanguins lyophilisés avec des résultats exprimés en U/mL alors que les CQE sont réalisés sur échantillons d'origine sanguine avec des résultats rendus en U/gHb. Le calcul a donc nécessairement été effectué en U/mL, en s'affranchissant du taux d'hémoglobine des échantillons de CQE.

La valeur d'incertitude de mesure élargie U obtenue, ramenée en pourcentage par rapport à la moyenne, a ensuite été comparée à l'Erreur Totale (TE) de Ricos, définie comme valeur cible par le laboratoire.

c) Comparaison de méthode

Lors de l'utilisation de la technique avec les réactifs Trinity Biotech, une biothèque de culots globulaires congelés à -80°C a été réalisée. 30 patients, dont 2 déficitaires ont ainsi pu être réanalysés avec la nouvelle technique Biosentec.

Les résultats obtenus avec les 2 méthodes ont été exploités à l'aide d'une droite de régression linéaire et d'une représentation graphique de Bland-Altman.

Le principe de la méthode proposée par Bland et Altman est d'analyser la concordance de deux séries de valeurs en appréciant l'écart observé entre les 2 valeurs obtenues pour la même mesure (94).

Les limites supérieures et inférieures du Bland-Altman ont été préétablies à partir de la moyenne des différences Trinity – Biosentec (m_d) et l'écart-type des différences Trinity – Biosentec (S_d) selon les formules suivantes :

- Limite supérieure = $m_d + 2 \times S_d$

- Limite inférieure = $m_d - 2 \times S_d$

d) Etendue de mesure et interférences

L'étendue de mesure, comprenant la limite de détection et l'intervalle de linéarité, ainsi que les interférences ont été définies en accord avec les données fournisseurs (G6PD Biosentec Ref.64 Notice version v14421) (90). La recherche d'autres interférences éventuelles a été effectuée par analyse bibliographique.

e) Influence du préanalytique sur les résultats

1- Variabilité inter-opérateur de la préparation des culots globulaires

Nous avons choisi d'effectuer une variabilité inter-opérateur sur cette partie préanalytique de préparation des culots globulaires, en prélevant 2 tubes ACD sur 3 patients différents. Un technicien habilité a effectué 3 culots globulaires à partir du premier tube, un deuxième technicien a effectué 3 autres culots globulaires à partir du second tube (Figure 23). Les différents culots globulaires ont été analysés dans une même série (même jour, même opérateur). Les résultats des activités enzymatiques obtenues (moyenne des 3 résultats correspondants au technicien 1 vs moyenne des 3 résultats correspondants au technicien 2) ont ensuite été comparés pour chaque patient par un test de Student au risque de 5%, afin d'objectiver une éventuelle variabilité inter-opérateur préanalytique.

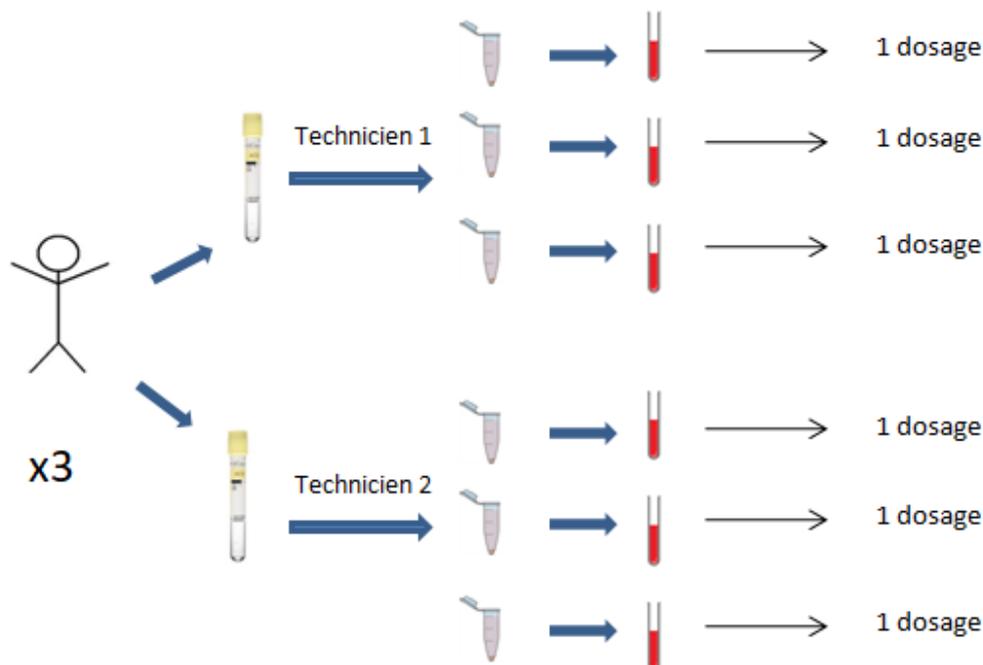


Figure 23 : Schéma représentatif de la variabilité inter-opérateur de la préparation des culots globulaires. La même manipulation a été réalisée sur trois patients différents.

2- Etude de la stabilité de l'hémolysât

Comme vu précédemment, quel que soit le fournisseur, l'activité enzymatique érythrocytaire est très sensible à la température. Les prélèvements doivent donc impérativement être acheminés à +4°C au laboratoire (66).

La durée de conservation des échantillons à 4-8°C a été étudiée par le fournisseur Biosentec et montre une diminution significative de l'activité enzymatique après plus de 24h de conservation à cette température (66) . La prise en charge des échantillons prélevés sur tube ACD reçus au laboratoire doit donc être faite dans les 24h après réception de l'échantillon, celui-ci étant conservé à +4°C durant ce délai.

Il n'existe en revanche pas de données sur la stabilité de l'hémolysât préparé à partir du culot globulaire.

Afin de tester la stabilité de ce dernier, nous avons utilisé 8 hémolysâts issus de 8 patients (1 hémolysât = 1 patient) pour lesquels un dosage de l'activité enzymatique et de la concentration en hémoglobine a été réalisé sur 2 temps différents (t =0h et t = +24h), les hémolysâts étant conservés à +4°C entre les 2 dosages (Figure 24).

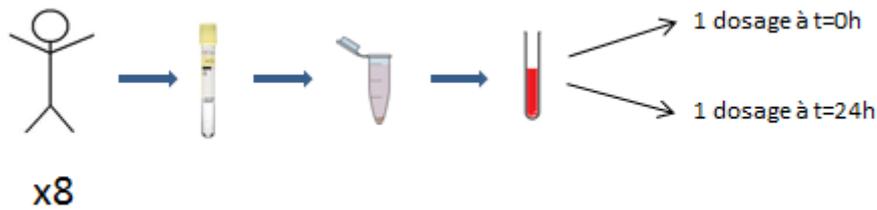


Figure 24 : Schéma représentatif de l'étude de la stabilité de l'hémolysât. La même manipulation a été réalisée sur 8 patients différents.

L'activité enzymatique obtenue sur les différents hémolysâts au temps t=0h a été considérée comme valeur attendue pour chacun des 8 patients.

La variation I (%) des activités enzymatiques obtenues sur les hémolysâts au temps t=24h (A_{t24h}) par rapport à cette valeur de référence (A_{t0h}) a été calculée selon la formule :

$$I(\%) = \frac{(A_{t24h} - A_{t0h})}{A_{t0h}} * 100$$

La variation d'activité enzymatique observée a ensuite été comparée à la limite acceptable de variation (ACL, Acceptable Change Limit) définie par Kaplan et *col.* (95) selon la formule :

$$ACL (\%) = 2,77 * CVa(\%)$$

Avec CVa : Coefficient de variation analytique (CV de fidélité intermédiaire)

Le facteur 2,77 dérivant de $Z * \sqrt{2}$ avec $Z = 1,96$ pour un risque de 5% et $\sqrt{2}$ car la comparaison est faite entre 2 valeurs ayant le même CVa.

Ainsi, un impact du délai entre la préparation de l'hémolysât et le dosage sur le résultat sera objectivé par une variation I% supérieure à l'ACL.

3- Etude de l'influence du remplissage du tube ACD

Il n'existe actuellement pas de tubes ACD adaptés à la pédiatrie sur le marché, contrairement aux tubes EDTA. Au CHU de Pellegrin, la pédiatrie représente près d'un quart des demandes de dosage (27% en regroupant la pédiatrie et la néonatalogie) sachant qu'un prélèvement de plus d'1mL de sang chez les nouveau-nés est difficilement réalisable.

Le remplissage des tubes est une variable pouvant influencer certains paramètres dosés au laboratoire, notamment en hémostase. Un tube non rempli correctement ne respecte pas la proportion anticoagulant/sang total préconisé par le fournisseur. Le fait de travailler à partir

de culots globulaires, c'est-à-dire une fraction concentrée en globules rouges permet en théorie de s'affranchir de cette variable, mais nous avons voulu nous en assurer.

Afin d'offrir aux services de soins la possibilité de doser la G6PD chez les nouveaux nés, une étude de la variation des résultats en fonction du remplissage des tubes ACD (6mL, 4mL, 2mL et 1mL) a été réalisée pour 3 patients (Figure 25). Un volume maximum de 1ml correspondant au volume cliniquement possible chez un nouveau-né.

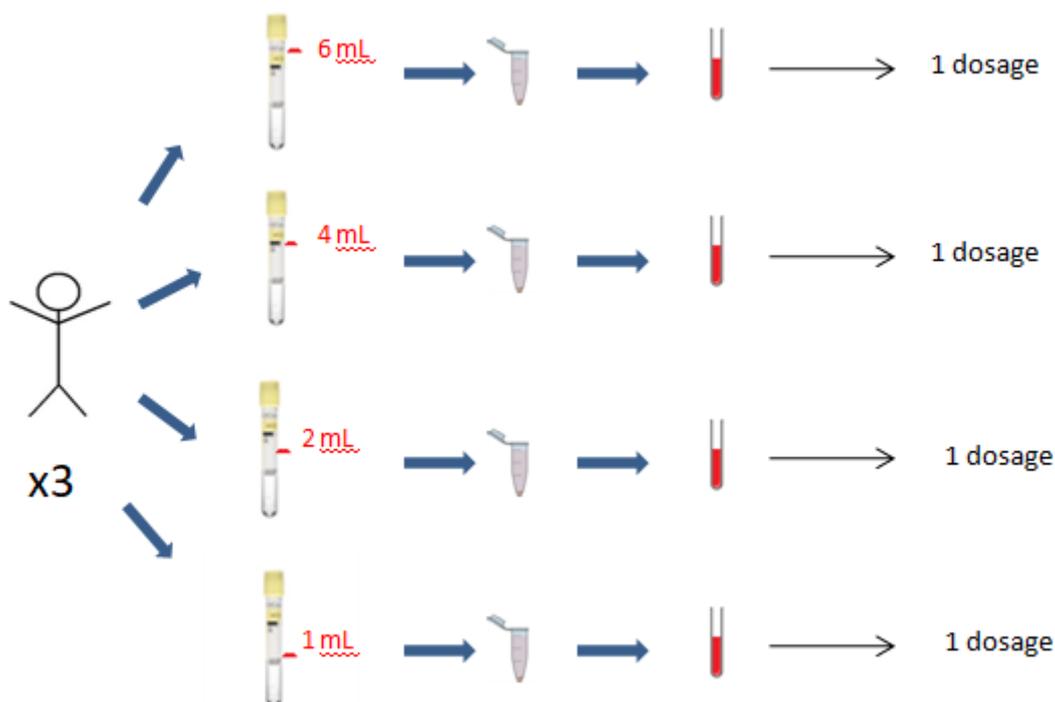


Figure 25: Schéma représentatif de l'étude de l'influence du remplissage du tube ACD. La même manipulation a été réalisée sur trois patients différents.

Nous avons procédé de la même manière que pour l'étude de la stabilité de l'hémolysât, en considérant l'activité enzymatique obtenue avec un volume de remplissage de 6mL comme valeur attendue pour chacun des 3 patients. Les variations I(%) des activités enzymatiques obtenues avec des volumes de remplissages inférieurs par rapport à cette valeur de référence ont été calculées et comparées à l'ACL. Ainsi, un impact du volume de remplissage sur le résultat sera objectivé par une variation I% supérieure à l'ACL.

f) Etablissement de nouveaux intervalles de références

Dans le but d'établir de nouveaux intervalles de référence en fonction de l'âge et du taux de réticulocytes, nous avons étudié les résultats obtenus sur des patients sains entre juillet et mai 2018, soit une durée de 10 mois.

Afin d'obtenir des échantillons les plus représentatifs possibles d'individus sains, nous avons écarté certains patients de nos analyses :

- Les patients déficitaires en G6PD (activité enzymatique < 6 U/gHb contrôlée)
- Les patients présentant une carence martiale, ces patients ayant en effet une activité enzymatique faussement augmentée (VGM < 80 fL et/ou carence martiale objectivée)
- Les femmes ayant une activité enzymatique > 6 U/gHb mais pour lesquelles un déficit hétérozygote est fortement suspecté dans le cadre d'une enquête familiale.

Afin d'étudier une potentielle influence du sexe sur l'activité enzymatique, une comparaison de l'activité enzymatique a été réalisée entre les hommes et les femmes âgés de plus de 1 an (globules rouges considérés comme matures) et ayant un taux de réticulocytes considéré comme normal (< 120 G/L) sur cette période.

Les patients âgés de plus de 1 an ont été séparés en 3 catégories selon leur taux de réticulocytes (< 80G/L, 80-120 G/L et > 120 G/L) et l'activité enzymatique moyenne obtenue dans chacun de ces groupes a été comparée à celle des autres groupes grâce à un test de Student pour un risque de 5%.

La population pédiatrique (< 1an) a été séparée en 2 catégories d'âges (0-7j et 8j-1an) quel que soit le taux de réticulocytes. Le taux de réticulocytes et les activités enzymatiques moyennes obtenues ont été comparés entre ces 2 catégories à l'aide d'un test de Student pour un risque de 5%.

Les intervalles de références de ces différentes catégories ont été calculés avec un intervalle de confiance à 99% centré autour de la médiane.

g) Analyse de risque

Une analyse de risques a été réalisée selon la méthode des 5M vue précédemment (Partie 1-B, paragraphe II-2-c-2) pour cette technique de dosage. Chaque étape, allant du prélèvement à la validation biologique des résultats, a été analysée selon cette méthode afin d'identifier les risques potentiels de défaillance, leurs causes, leurs effets et les moyens de maîtrise existant au laboratoire. Un indice de criticité (ICR) est attribué à chacun de ces risques de défaillance, dépendant de sa gravité (G), de sa fréquence (F) et de sa détectabilité (D).

Avec : $ICR = G * F * D$

Des seuils d'alerte et de priorisation ont été fixés respectivement à 10 et 16 afin d'identifier au mieux les points critiques de la technique.

h) Fiches de formation et d'habilitation du personnel

Des fiches de formation et d'habilitation pour les techniciens ont été réalisées afin de garantir les compétences des techniciens habilités.

4) Etude des résultats des dosages enzymatiques

Une extraction des données concernant les dosages de l'activité enzymatique de la G6PD réalisés sur la période du 1^{er} août 2017 au 31 mars 2018, soit une période de 8 mois, a été faite à partir du logiciel Synergie.

5) Génotypage des variants de la G6PD

Certains patients ayant bénéficié d'un génotypage des principaux variants de la G6PD, nous avons confrontés nos résultats enzymatiques à ceux moléculaires pour lesquels l'information était disponible.

La recherche moléculaire de variant de la G6PD s'effectue au laboratoire de biochimie du CHU de Pellegrin dans le secteur de génétique, sous la responsabilité du Dr Ged.

La recherche repose sur la technique HRM (High Resolution Melt), ou analyse des courbes de fusion à haute résolution.

Seuls les variants de type A- et Méditerranéen sont recherchés (amplification des exons 4 et 6 uniquement), ces deux variants couvrant 90% des déficits dans notre région. En cas de forte suspicion clinique et biologique chez un individu pour lequel la présence d'un autre variant est suspectée de par son origine géographique, le prélèvement pourra être envoyé au centre de référence à Marseille pour recherche d'autres variants.

III-Résultats

1) Evaluation des performances de la méthode

a) Fidélité

1- Répétabilité

Les résultats obtenus lors de l'étude de la répétabilité sur CQI et sur sang sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Résultats obtenus pour la répétabilité sur CQI et sur sang

REPETABILITE SUR CQI						
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (U/mL)	Ecart-type (U/mL)	CV (%)	CV (%) retenu par le laboratoire = CV de répétabilité souhaitable de Ricos	Conclusion
CQI bas	5	0,12	0,004	3,18	12,3	Conforme
CQI haut	5	0,49	0,01	1,15	12,3	

REPETABILITE SUR SANG						
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (U/gHb)	Ecart-type (U/gHb)	CV (%)	CV (%) retenu par le laboratoire = CV de répétabilité minimal de Ricos	Conclusion
Patient valeur seuil	10	8,0	1,3	16,2	18,5	Conforme
Patient valeur haute	10	14,4	2,1	14,5	18,5	

Les CV expérimentaux obtenus pour les 2 niveaux de CQI sont inférieurs au CV de répétabilité souhaitable de Ricos.

Les CV obtenus sur les 2 échantillons sanguins de patients, l'un avec des valeurs d'activité enzymatique élevées et l'autre avec des valeurs proches du seuil de décision de 6 U/gHb, sont inférieurs au CV de répétabilité minimal de Ricos.

Les résultats sont donc conformes aux exigences attendues par le laboratoire.

2- Fidélité intermédiaire

Les résultats obtenus lors de l'étude de la fidélité intermédiaire sur CQI et sur sang sont respectivement présentés dans le Tableau 6 et 7.

Tableau 6 : Résultats obtenus pour la fidélité intermédiaire sur CQI

FIDELITE INTERMEDIAIRE						
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (U/mL)	Ecart-type (U/mL)	CV (%)	CV (%) retenu par le laboratoire = CV de reproductibilité souhaitable de Ricos	Conclusion
CQI bas	30	0,14	0,01	7,48	16,4	Conforme
CQI haut	30	0,52	0,03	6,03	16,4	

Les CV expérimentaux obtenus pour les 2 niveaux de CQI sont inférieurs au CV de reproductibilité souhaitable de Ricos. Les résultats sont donc conformes aux exigences attendues par le laboratoire.

Tableau 7 : Résultats obtenus pour la fidélité intermédiaire sur échantillons sanguins

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
culot 1	8,3	9,2	6,4	10,6	11,1	7,5
culot 2	10,6	9,4	11,1	7,4	9,8	10,8
culot 3	9,3	10,5	9,9	9,2	9,4	12,2
culot 4	9,7	12,9	7,7	7,2	10,6	13,4
Moyenne (U/gHb)	9,5	10,5	8,8	8,6	10,2	11,0
ET (U/gHb)	1,0	1,7	2,1	1,6	0,8	2,5
CV (%)	10,1	15,9	24,1	18,7	7,7	22,9
CV de reproductibilité minimal de Ricos (%)	24,4	24,4	24,4	24,4	24,4	24,4

Les CV expérimentaux obtenus entre les différents culots globulaires pour les 6 patients sont tous inférieurs au CV minimal de reproductibilité de Ricos et donc conformes aux exigences du laboratoire.

Le CV moyen expérimental obtenu est de 16,6%.

b) Exactitude et incertitude de mesure

Il n'existe actuellement pas de programme d'externalisation des CQI pour le dosage de l'activité enzymatique de la G6PD, l'estimation de la justesse n'est donc pas envisageable par cette méthode.

Comme vu précédemment (partie 1-B, paragraphe 2-b), dans les cas où l'estimation de la justesse n'est pas possible, une estimation de l'exactitude peut être effectuée à partir des résultats des CQE. Le laboratoire participe au programme de CQE UKNEQAS depuis le mois de janvier 2018, ce qui nous permet d'avoir à ce jour 8 résultats disponibles (Tableau 8).

Tableau 8 : Résultats des CQE (UKNEQAS) et estimation de l'exactitude de notre méthode

EXACTITUDE						
Contrôles quantitatifs <input checked="" type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>						
Echantillons	Valeur Labo (U/gHb)	Valeur Labo (U/mL)	Cible (groupe de pairs) (U/gHb)	z-score	Performance score	Conclusion ⁵
1801G61	9,5	0,15	9,7	0,09	6,53	Conforme
1801G62	8,3	0,11	9,4	0,57	6,53	Conforme
1802G61	12	0,17	9,9	0,84	38,2	Conforme
1802G62	0	0	1,6	2,32	38,2	Valeur rendue = 0 mais limite de linéarité de notre méthode à 2 U/gHb
1803G61	8	0,14	9,1	0,48	58,18	Conforme
1803G62	6,4	0,07	9,8	1,51	58,18	Conforme
1804G61	0	0	2.1	2.90	93.82	Valeur rendue = 0 mais limite de linéarité de notre méthode à 2 U/gHb
1804G62	6	0,10	9.4	1.32	93.82	Conforme

Parmi ces 8 échantillons, 6 étaient non déficitaires en G6PD et 2 déficitaires (échantillons 1802G62 et 1804G61).

La conclusion du laboratoire concernant le statut déficitaire ou non de l'échantillon est conforme aux résultats attendus par le fournisseur pour tous les échantillons traités.

Tous nos z-scores sont inférieurs à 2, à l'exception des échantillons déficitaires (1802G62 et 1804G61) ayant des valeurs cibles proches de notre limite inférieure de linéarité de 2 U/gHb. La valeur 0 a été retenue pour ces échantillons, le laboratoire ne pouvant pas rendre de valeur numérique <2 U/gHb, ce qui a engendré un z-score >2.

Cela n'aurait cependant eu aucun impact clinique dans le cadre d'un résultat de patient, qui aurait été considéré comme déficitaire en G6PD avec une activité effondrée.

Notre score de performance calculé sur les 6 premières valeurs de l'année 2018 est de 58,18, soit inférieur à 100 et donc conforme aux exigences du laboratoire. En tenant compte des 8 valeurs de l'année 2018, il est de 93,82, restant sous le seuil de 100 préconisé par le fournisseur.

Concernant le calcul de l'incertitude de mesure de notre technique, les valeurs obtenues sont présentées sur le Tableau 9.

Les valeurs moyennes de la fidélité intermédiaire sur CQI sont de 0,14 U/mL pour le CQI bas et de 0,52 U/mL pour le CQI haut, correspondant respectivement à une activité enzymatique normale de la G6PD et une activité enzymatique élevée.

L'incertitude de mesure élargie calculée à partir du niveau bas des CQI ($U = 0,05$ U/mL) est donc applicable aux patients ayant une activité enzymatique normale de la G6PD.

L'incertitude de mesure n'a pas pu être définie sur les patients déficitaires, aucun niveau de CQI n'étant représentatif de cette catégorie de patients.

Concernant les patients présentant une activité enzymatique élevée, l'incertitude de mesure peut être approchée par l'utilisation de la variance du niveau haut des CQI (Incertaince élargie $U = 0,08$ U/mL), malgré le fait qu'aucun CQE des campagnes 2018 ne possède d'activité enzymatique supérieure à 10 U/gHb.

Appliquée aux résultats de patients, l'incertitude de mesure de la technique est donc évaluée :

- Pour des valeurs d'activité enzymatique normales : résultat $\pm 0,05$ U/mL
- Pour des valeurs d'activité enzymatique élevées : résultat $\pm 0,08$ U/mL

Par exemple, pour un résultat mesuré à 9,5U/gHb (0,172 U/mL), l'activité enzymatique est en réalité comprise entre 6,9 U/gHb et 12,2 U/gHb.

La conformité de l'incertitude de mesure est établie par comparaison de cette dernière, ramenée en pourcentage par rapport à la moyenne, à l'erreur totale de Ricos (évaluée à 38,5% pour le dosage de l'activité enzymatique de la G6PD). Nos résultats sont conformes pour les 2 niveaux concernés.

Tableau 9 : Tableaux de calcul de l'incertitude de mesure

CQI (Fidélité intermédiaire)	Niveau haut	Niveau bas
Moyenne (U/mL)	0,52	0,14
Variance : $u^2(\text{CQI})$ (U/mL)	0,0010	0,0001

CQE	
Variance : $u^2(\text{CQE})$ (U/mL)	0,0005

Incertitude de mesure	Niveau haut	Niveau bas
$u = \sqrt{u^2(\text{CQI}) + u^2(\text{CQE})}$ (U/mL)	0,04	0,02
Incertitude élargie $U = 2 \times u$ (U/mL)	0,08	0,05

	Niveau haut	Niveau bas
U/moyenne x 100 (%)	14,7	34,9
TE Ricos (%)	38,5	38,5
	Conforme	Conforme

c) Comparaison de méthodes

Les résultats des 30 prélèvements analysés par les deux techniques, Trinity et Biosentec, sont présentés sur les Figures 26 et 27. L'étendue des mesures obtenues s'étend d'une activité < 2U/g Hb à 23 U/gHb.

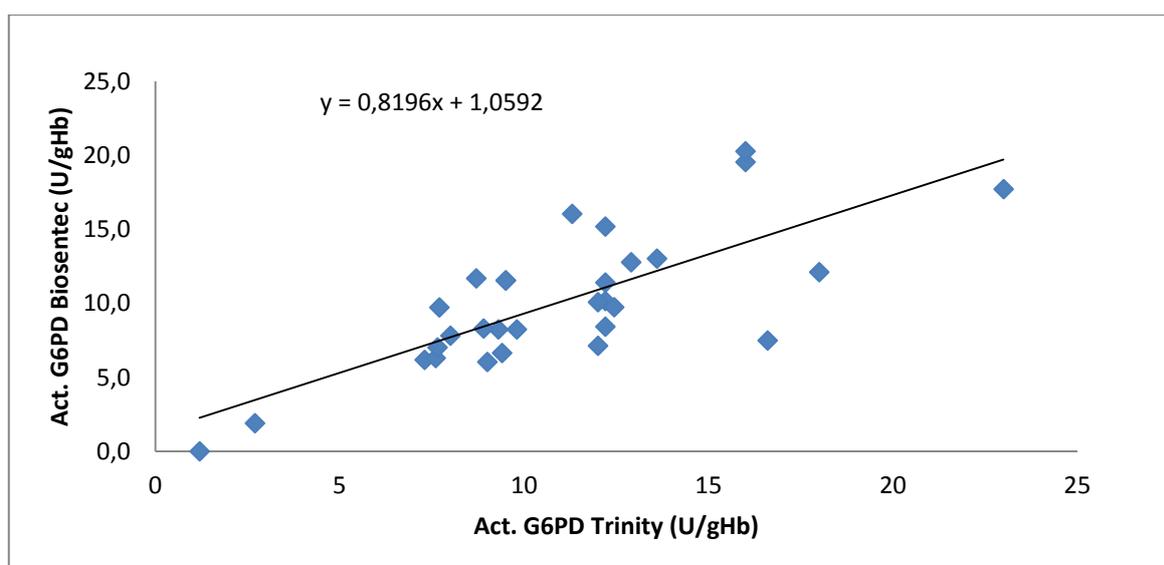


Figure 26 : Comparaison de l'activité enzymatique de la G6PD entre la technique Biosentec et la technique Trinity

Le calcul du coefficient de corrélation n'a pas d'intérêt dans le cadre d'une comparaison de méthode. En effet, il ne s'applique qu'à des variables indépendantes, ce qui n'est pas le cas d'une comparaison de méthode. Grâce à l'équation de la droite de régression ($Y=ax+b$), on peut néanmoins exprimer la similitude des méthodes comparées (optimale avec pente égale à 1 et ordonnée à l'origine égale à zéro).

Les résultats statistiques des tests t de Student montrent que la pente n'est pas significativement différente de 1 ($p=0,182$) et que l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de zéro ($p=0,505$).

On peut donc conclure que les résultats obtenus avec les deux méthodes sont équivalents.

Le graphique de Bland-Altman (Figure 27) permet la représentation des différences observées entre les 2 mesures en fonction du niveau de concentration.

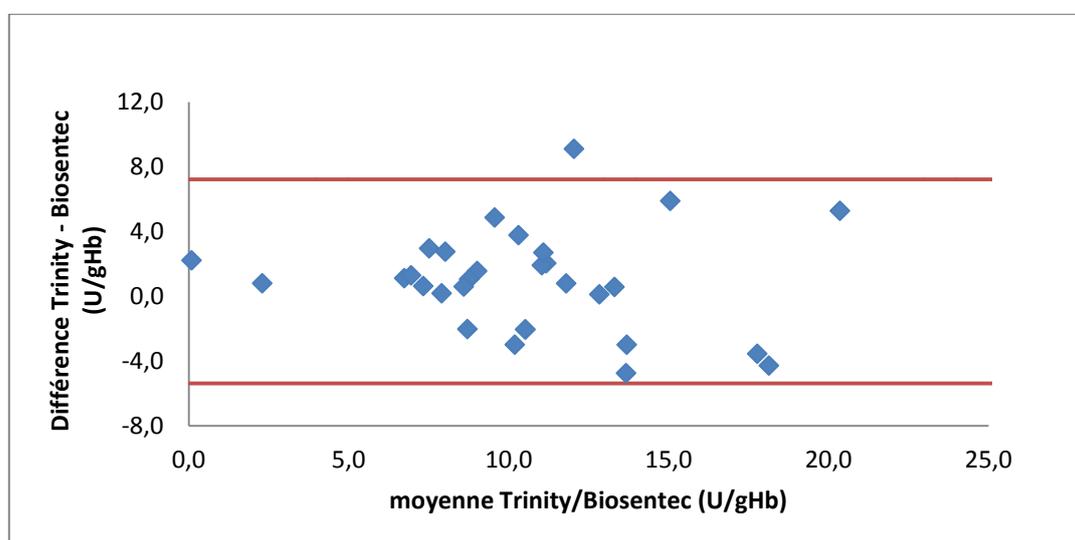


Figure 27 : Représentation graphique de Bland-Altman pour la comparaison de méthodes Trinity/Biosentec

Une seule valeur parmi les 30 sort des limites préétablies et présente donc une différence de résultat entre les deux techniques supérieure à celle attendue par le laboratoire. Ce patient présente un dosage enzymatique égal à 16,6 U/gHb avec la technique Trinity et 7,5 U/gHb avec la technique Biosentec. Dans les deux cas, le patient de sexe masculin est considéré comme non déficitaire, cette différence n'a donc pas d'impact quant à la prise en charge du patient, bien que statistiquement significative.

Parmi les 30 patients, aucune discordance dans l'interprétation du dosage n'a été observée entre les deux techniques : les 2 patients déficients en technique Trinity ont une activité

enzymatique < 2 g/Hb avec la technique Biosentec, et les 28 patients non déficitaires en technique Trinity ont une activité > 6 g/Hb avec la technique Biosentec.

d) Etendue de mesure et interférences

Selon les données du fournisseur, la limite de détection a été évaluée à 0,002 U/mL.

La limite de quantification est évaluée par le fournisseur à 0,02 U/mL, soit 2,03 U/gHb pour un taux d'Hb à 14,8 g/dL.

La limite supérieure de linéarité est de 0,500 U/mL soit 50,68 U/gHb pour un taux d'Hb à 14,8 g/dL.

Les résultats sortant de cet intervalle de linéarité [0,02 – 0,500 U/mL] seront rendus < 2 U/gHb ou > 50 U/gHb.

Concernant les interférences pouvant influencer les résultats de cette technique, Biosentec ne décrit pas d'interférences en termes d'hyperleucocytose, d'hémolyse, d'ictère ou de lipémie dans les données fournies. Le dosage étant réalisé à partir de culots globulaires, le plasma et les globules blancs sont retirés lors de la phase préanalytique de préparation de ces culots, ce qui permet de s'affranchir de ces éventuelles interférences.

Par ailleurs, aucune substance interférente avec ce dosage enzymatique n'a été retrouvée par analyse de la littérature.

e) Influence du préanalytique sur les résultats

1- Variabilité inter-opérateur de la préparation des culots globulaires

Afin d'objectiver une éventuelle variabilité inter-opérateur sur la partie préanalytique de cette technique de dosage, 2 techniciens habilités différents ont préparé 3 culots globulaires à partir de tubes prélevés sur 3 patients différents. Les données issues du dosage de l'activité enzymatique des différents culots sont représentées graphiquement sur la Figure 28.

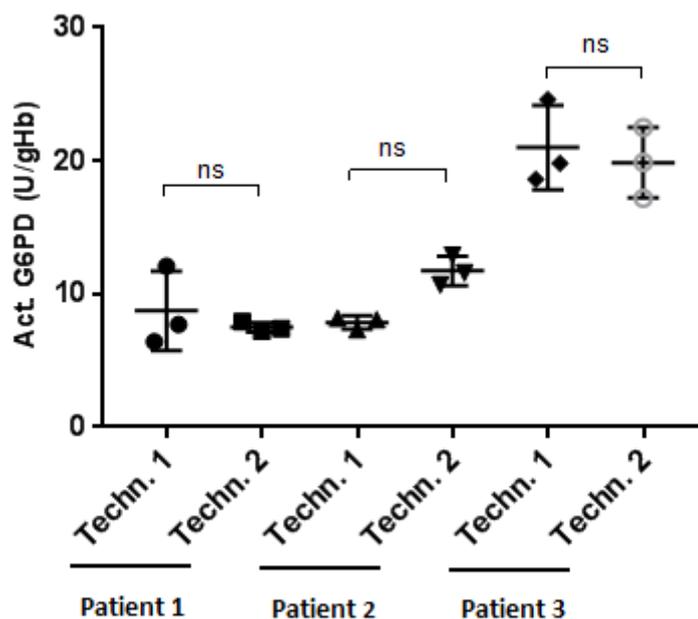


Figure 28 : Représentation graphique de la variabilité inter-opérateur préanalytique. Activité enzymatique G6PD obtenue à partir de culots globulaires réalisés par 2 techniciens différents sur 3 patients. (ns: non significatif)

La comparaison des activités enzymatiques des culots globulaires réalisés par les deux techniciens ne montre pas de différence significative pour chacun des 3 patients ($p = 0,517$; $0,053$; $0,642$ respectivement). La variabilité inter-opérateur préanalytique n'est donc pas significative.

2- Etude de la stabilité de l'hémolysât

Les activités enzymatiques et les concentrations en hémoglobine de 8 hémolysâts ont été dosées à $t=0h$ et $t=+24h$ afin d'étudier leur stabilité au sein de cet hémolysât. La représentation de la variation d'activité enzymatique I(%) au temps $t=24h$ est présentée sur la Figure 29. Cette variation est comparée au seuil limite ACL fixé par le laboratoire, avec :

$ACL = 2,77 \times CVa$ où $CVa = CV$ de fidélité intermédiaire sur sang = 16,6%

$ACL = 46,0\%$

A $t=+24h$, le dosage de l'hémoglobine sur les différents hémolysâts a donné des résultats strictement identiques à ceux du premier dosage, démontrant que le taux d'hémoglobine reste stable au moins 24h au sein de l'hémolysât.

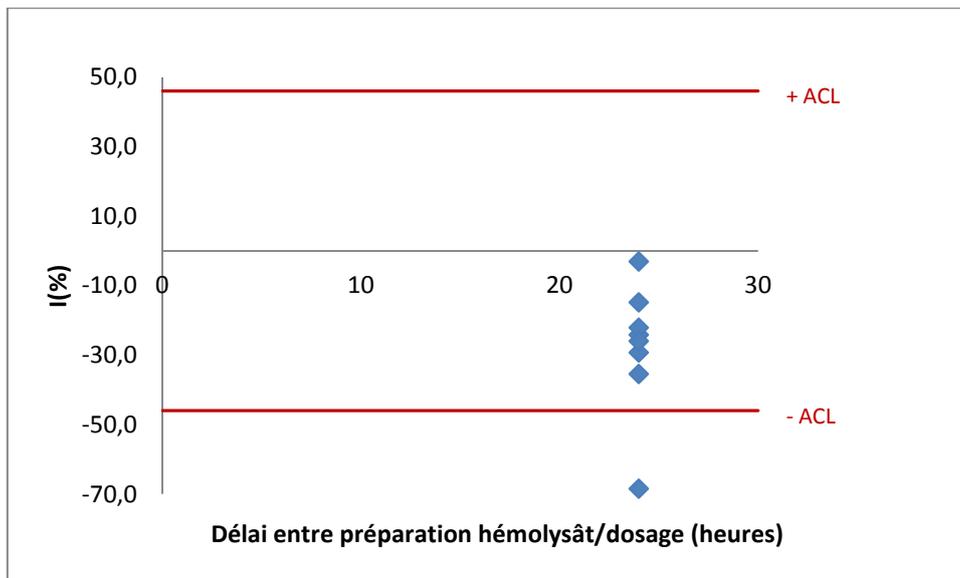


Figure 29 : Représentation graphique des variations I% de l'activité enzymatique G6PD obtenues sur le dosage de l'hémolysât à t=24h.

Concernant l'activité enzymatique, parmi les 8 échantillons testés, 1 seul sort de la limite acceptable fixée par le laboratoire. On observe cependant une diminution de l'activité enzymatique sur tous les échantillons à t=24h (diminution moyenne : 5 U/gHb, min-max : 0,9-11,1 U/gHb) (Figure 30).

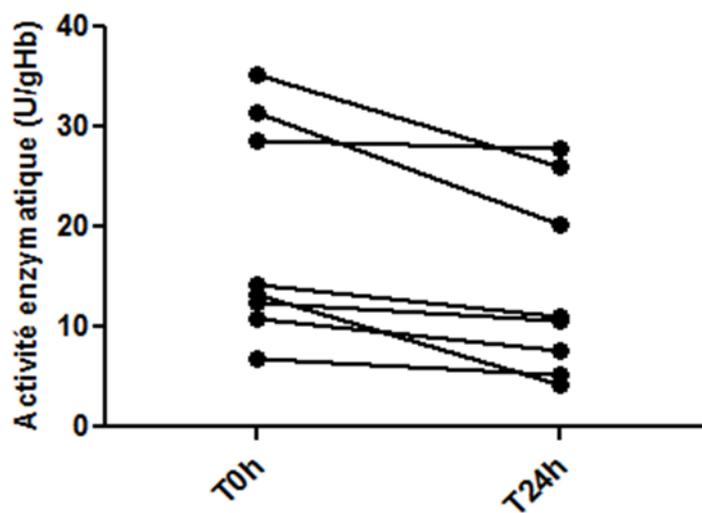


Figure 30 : Représentation graphique des activités enzymatiques au sein de l'hémolysât à t=0h et t=24h.

De plus, tous les patients présentaient une activité enzymatique dans les valeurs normales lors du premier dosage à t=0h, alors que 2 patients présentent une activité enzymatique < 6

U/gHb sur les dosages réalisés à t=+24h et pourraient à tort être considérés comme déficitaires.

Nous avons donc choisi de n'utiliser que l'hémolysât préparé à t=0h. Si un redosage s'avérait nécessaire, un nouvel hémolysât préparé à partir d'un nouveau culot globulaire serait préférable.

3- Etude de l'influence du remplissage du tube ACD

L'activité enzymatique de la G6PD a été comparée chez 3 patients pour différents volumes de remplissage du tube ACD afin d'étudier l'impact du remplissage du tube sur les résultats obtenus et de définir si nécessaire une limite inférieure de remplissage du tube (Tableau 10).

Tableau 10: Activité enzymatique de la G6PD (U/gHb) en fonction du volume sanguin prélevé

Volume sang (mL)	Patient 1	Patient 2	Patient 3
6 = Valeur attendue	9,3	8,1	7,7
4	9,7	6,7	7,2
2	12,9	7,0	10,6
1	9,1	10,3	6,4

Le seuil limite fixé par le laboratoire est identique à celui utilisé dans l'étude de la stabilité de l'hémolysât (ACL = 46%)

La représentation graphique des variations % obtenues avec les différents volumes de remplissage est représentée sur la Figure 31.

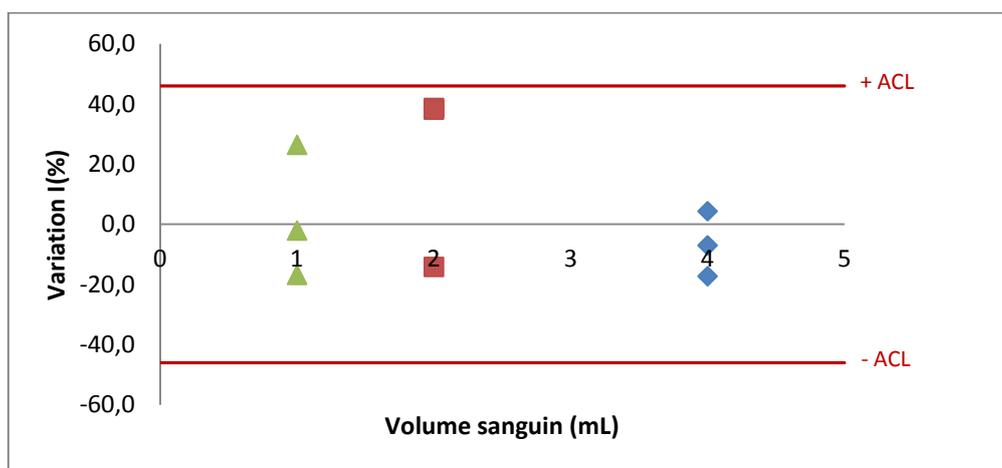


Figure 31 : Représentation graphique des variations % obtenues pour les différents volumes de remplissage (4mL, 2mL et 1mL).

Pour les trois volumes de remplissage testés (4mL, 2mL et 1mL), les variations d'activité enzymatique obtenues sont inférieures au seuil limite fixé par le laboratoire.

Le volume de remplissage du tube ACD n'influence donc pas significativement l'activité enzymatique, et les services pédiatriques peuvent de ce fait utiliser les tubes classiques en les remplissant d'au moins 1mL de sang.

f) Etablissement de nouveaux intervalles de références

Le fournisseur Biosentec propose un unique intervalle de référence (6-14 U/gHb) quel que soit l'âge et le taux de réticulocytes. Nous avons vu précédemment (partie 1-A, paragraphe V-2-c) que ces deux paramètres influençaient de façon significative les résultats de l'activité enzymatique de la G6PD, et qu'il est indispensable de les prendre en compte pour l'interprétation des résultats.

1- Patients âgés de plus de 1 an

Concernant les patients âgés de plus de 1 an, âge pour lequel les érythrocytes sont considérés comme matures, les résultats des dosages enzymatiques ont été analysés en fonction du taux de réticulocytes (Figure 32).

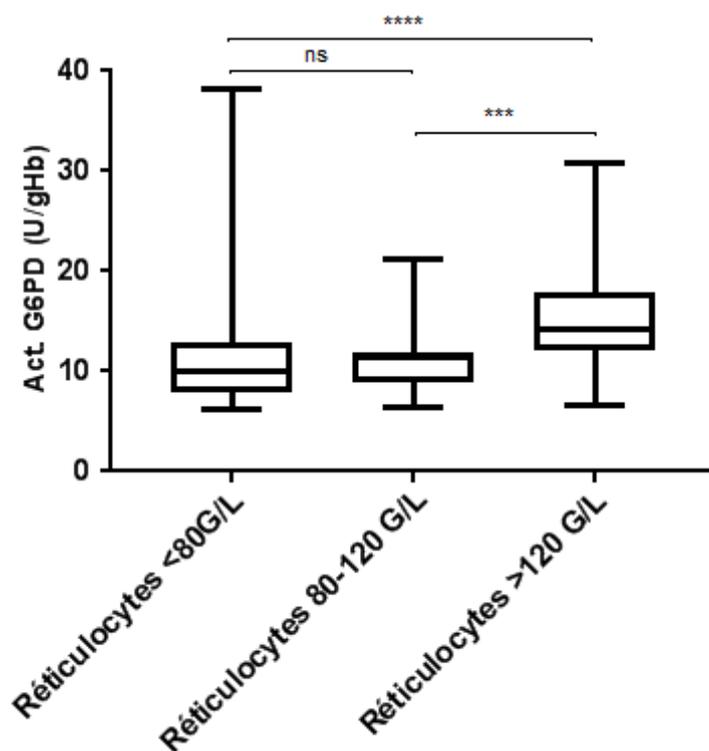


Figure 32 : Comparaison de l'activité enzymatique G6PD en fonction des réticulocytes obtenue chez les patients non déficitaires > 1 an (ns: non significatif)

L'activité enzymatique obtenue chez les patients ayant moins de 80 G/L réticulocytes n'est pas significativement différente de celle des patients ayant entre 80 et 120 G/L réticulocytes ($p = 0,575$). Nous avons donc choisi de regrouper ces deux catégories pour établir nos intervalles de références.

En revanche, l'activité enzymatique obtenue chez les patients ayant plus de 120 G/L réticulocytes est significativement plus élevée que celle obtenue chez les patients ayant moins de 80 G/L réticulocytes et chez ceux ayant 80-120 G/L réticulocytes (respectivement, $p < 0,0001$ et $p = 0,0005$), justifiant l'intérêt d'avoir un intervalle de référence spécifique pour cette catégorie de patients.

Nous avons également comparé l'activité enzymatique entre hommes et femmes pour un taux de réticulocytes inférieur à 120G/L afin de savoir s'il était pertinent d'établir des intervalles de références différents en fonction du sexe (Figure 33).

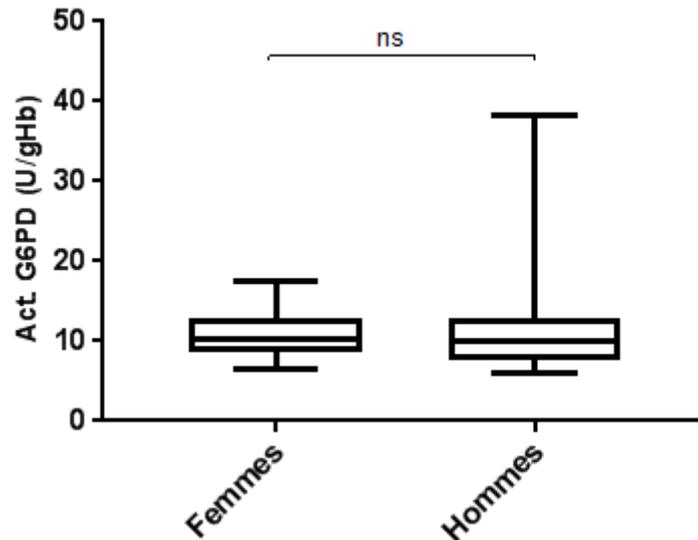


Figure 33 : Comparaison de l'activité enzymatique G6PD en fonction du sexe chez les patients non déficitaires > 1an ayant un taux de réticulocytes <120G/L (ns: non significatif)

L'activité enzymatique obtenue n'est pas significativement différente entre les hommes et les femmes ($p=0,602$). Il n'est donc pas nécessaire d'avoir des intervalles de référence différents en fonction du sexe.

Les données concernant l'activité enzymatique obtenue chez les patients de plus de 1 an en fonction du taux de réticulocytes sont résumées dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Récapitulatif des données d'activité enzymatique obtenues chez les patients non déficitaires > 1an

Réticulocytes (G/L)	<120	>120
Moyenne (U/gHb)	10,7	15,5
Médiane (U/gHb)	10,2	14,3
ET (U/gHb)	3,6	5,8
CV(%)	34,0	37,5
effectif	159	30
Intervalle de référence (IC99%)		
borne inférieure (U/gHb)	9,5	11,5
borne supérieure (U/gHb)	11,0	17,0

Les intervalles de références obtenus pour les patients de plus de 1 an sont donc les suivantes :

- Réticulocytes < 120 G/L : 9,5-11,0 U/gHb
- Réticulocytes > 120 G/L : 11,5-17,0 U/gHb

2- Patients âgés de moins de 1 an

Concernant les patients de moins de 1 an, l'activité enzymatique a été comparée entre les nouveau-nés de 0 à 7 jours et les enfants de 8 jours à 1an (Figure 34).

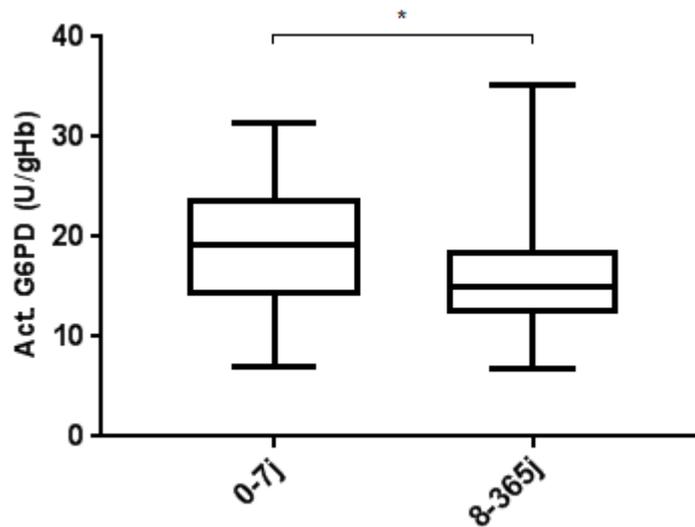


Figure 34 : Comparaison de l'activité enzymatique de la G6PD entre les nouveau-nés de 0-7j et les enfants de 8-365j.

On observe une différence significative entre les activités enzymatiques obtenues chez les nouveau-nés de moins de 8 jours et celles des enfants âgés de 8 jours à 1 an ($p=0,043$), nécessitant d'établir des intervalles de référence différents pour ces deux catégories d'âge.

Le taux de réticulocytes de ces deux catégories est représenté sur la figure 35.

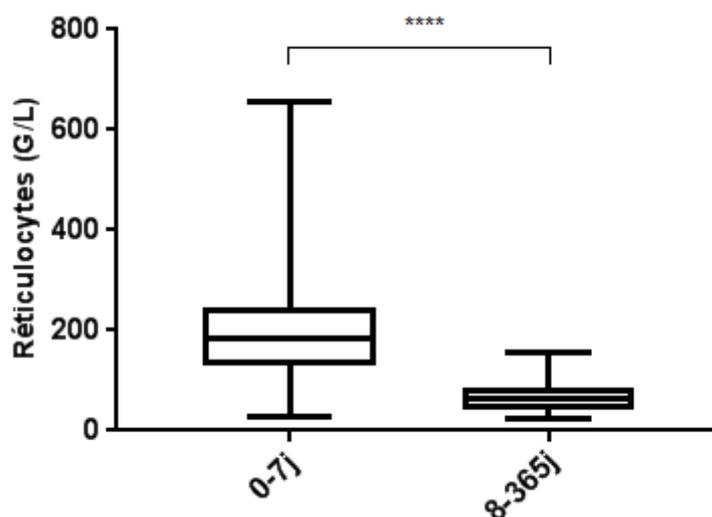


Figure 35 : Comparaison du taux de réticulocytes entre les nouveau-nés de 0-7j et les enfants de 8-365j.

Les nouveau-nés âgés de moins d'une semaine présentent un taux de réticulocytes significativement plus élevé que les enfants âgés de 8 jours à 1 an ($p < 0,0001$), ce qui participe vraisemblablement à la différence d'activité enzymatique retrouvée entre ces deux catégories d'âge.

Les données concernant l'activité enzymatique obtenues chez ces 2 catégories de patients sont résumées dans le Tableau 12.

Tableau 12: Récapitulatif des données d'activité enzymatique obtenues chez les patients non déficitaires < 1an

Age (jours)	0-7	8-365
Moyenne (U/gHb)	19,4	16,1
Médiane (U/gHb)	19,1	15,0
ET (U/gHb)	6,3	6,2
CV(%)	32,2	38,3
effectif	30	30
Intervalle de référence (IC99%)		
borne inférieure (U/gHb)	16,1	12,1
borne supérieure (U/gHb)	22,0	17,9

Les intervalles de références obtenus pour les patients de moins de 1 an sont donc les suivantes :

- Nouveau-nés de 0-7 jours : 16,1-22,0 U/gHb
- Enfants de 8 à 365 jours : 12,1-17,9 U/gHb

g) Analyse de risque

L'analyse de risque réalisée pour cette technique est présentée en Annexe II.

Il en ressort plusieurs points critiques, pour lesquels le laboratoire a développé des moyens de maîtrise afin d'en limiter l'impact au maximum.

La formation des prescripteurs et des préleveurs sur les conditions de prélèvement et d'acheminement ainsi que sur l'importance des renseignements cliniques et d'une prescription de NFS/réticulocyte associée est un élément primordial. Une note d'information a été diffusée aux services, par le biais d'une note diffusée de façon bimestrielle sur les changements de conditions préanalytiques mise en place par le pôle de biologie, afin de les informer et de les sensibiliser à cette nouvelle technique.

Un rappel des conditions préanalytiques est par ailleurs réalisé oralement à chaque prélèvement non conforme, lors de la demande d'un nouveau prélèvement.

Le second point critique concerne la formation des techniciens du laboratoire, tant sur la partie manuelle préanalytique et analytique que sur la connaissance de la technique et de

ses principales limites. Des modes opératoires ainsi qu'une procédure de formation et d'habilitation du personnel ont été développés afin de garantir la compétence des techniciens concernés.

h) Fiche de formation et d'habilitation du personnel

Les fiches de tutorat et d'habilitation des techniciens pour le dosage de l'activité enzymatique de la G6PD sont présentées en Annexe III et IV.

Elles décrivent les modalités d'habilitation du technicien, en insistant sur les points critiques de la technique. La formation pratique est réalisée en binôme avec un technicien habilité et un module de formation théorique doit être suivi par le technicien. Un quizz d'évaluation est également proposé afin de s'assurer des connaissances du technicien sur la technique.

2) Etude des résultats des dosages enzymatiques

Une extraction des données entre le 1^{er} août 2017 et le 31 mars 2018, soit une période de 8 mois, a montré un nombre total de 326 dosages de l'activité enzymatique de la G6PD, soit une moyenne de 40,8 dosages par mois. Sur cette période, 30 patients (31 dosages) ont présenté une activité enzymatique <6 U/gHb, soit une moyenne de 3,9 dosages par mois (9,5%) (Figure 36).

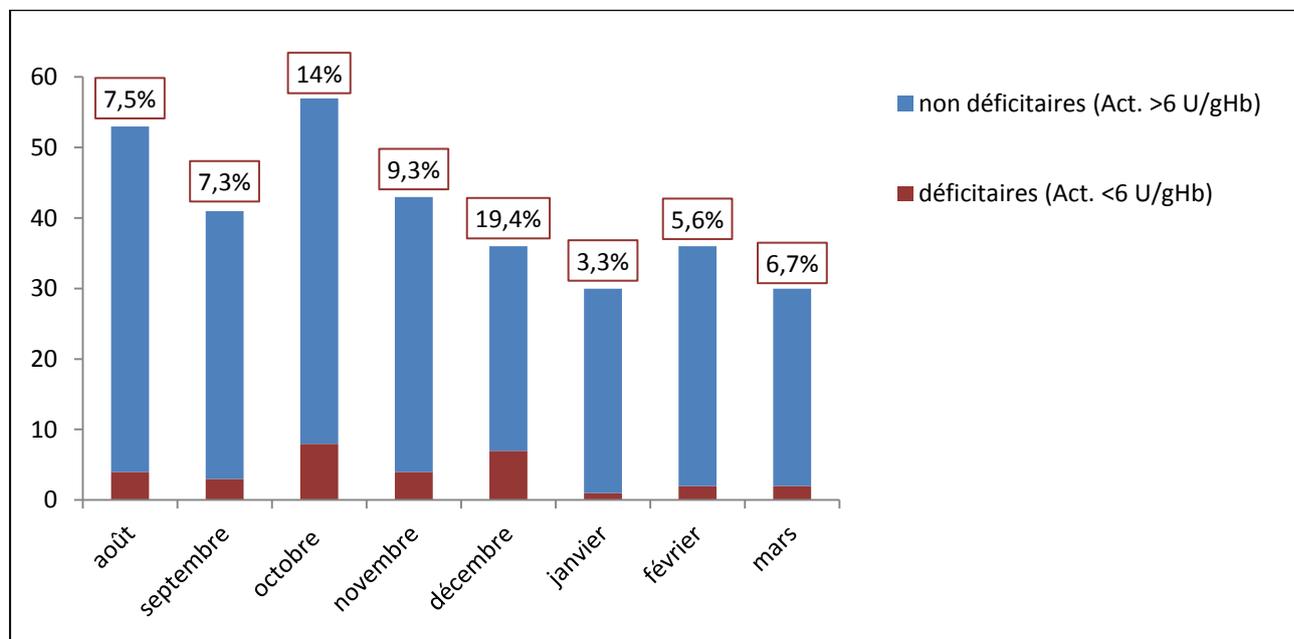


Figure 36 : Représentation graphique du nombre de dosages mensuels avec la proportion des dosages ayant une activité enzymatique < 6 U/gHb sur la période du 1/08/17 au 31/03/18. Les dosages de patients ayant une activité enzymatique > 6 U/gHb sont représentés en bleu, ceux de patients ayant une activité enzymatique < 6 U/gHb en rouge. Le pourcentage mensuel de dosage présentant une activité enzymatique <6 U/gHb est indiqué dans les étiquettes encadrées en rouge.

La répartition des services prescripteurs durant cette période est représentée sur la figure 37.

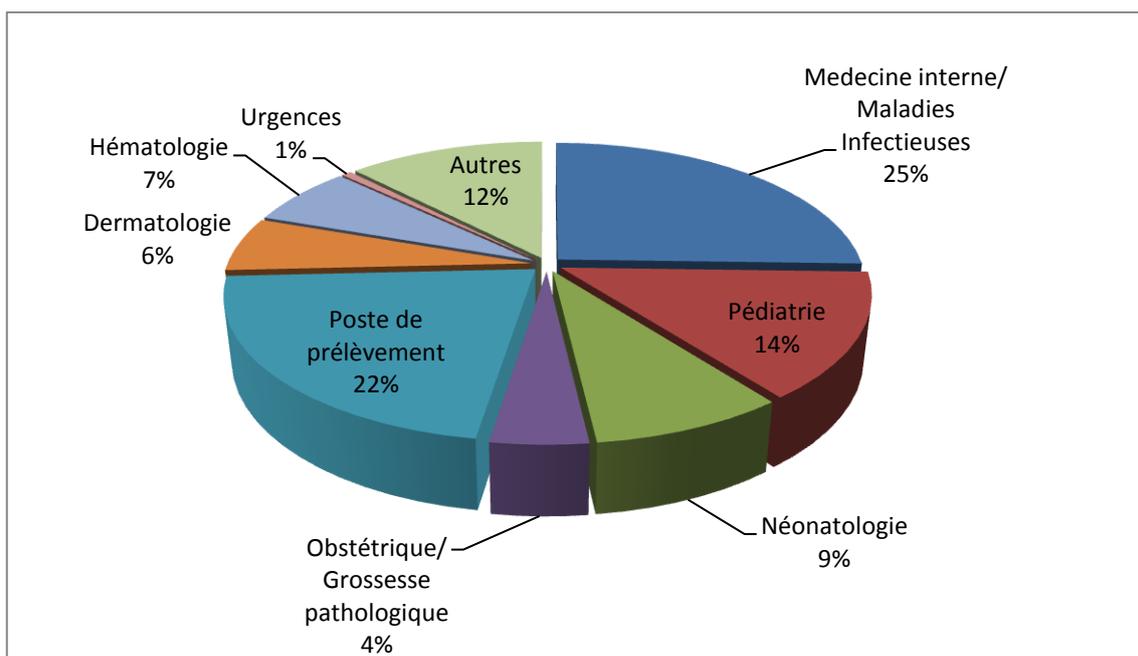


Figure 37 : Diagramme de répartition des prescriptions de dosage de l'activité enzymatique G6PD en fonction des services durant la période du 1/08/17 au 31/03/18.

Les principaux services prescripteurs sont les services de médecine interne/maladies infectieuses (25%), le poste de prélèvement (adulte + pédiatrie, 22%), et le service de pédiatrie (14%). Les prescriptions émanant du poste de prélèvement concernent majoritairement des patients primo-arrivants ayant bénéficié d'une consultation au moment de leur arrivée sur le territoire français alors que le bilan systématique du patient drépanocytaire ou porteur d'une autre hémoglobinopathie est principalement assuré par les services de maladies Infectieuses et de pédiatrie. Les prescriptions du service de dermatologie (6%) concernent toutes des bilans pré-thérapeutiques avant traitement par un médicament contre-indiqué en cas de déficit (Dapsone dans la totalité des cas).

La catégorie « Autres » comprend les demandes d'hôpitaux extérieurs sous-traitant l'analyse dans notre laboratoire (Libourne), mais également les services de réanimation, cardiologie, neurologie et néphrologie.

La répartition des contextes cliniques de demande de dosage d'activité enzymatique et la proportion de dosage ayant une activité enzymatique < 6 U/gHb en fonction de ces contextes cliniques sont présentées sur les Figures 38 et 39.

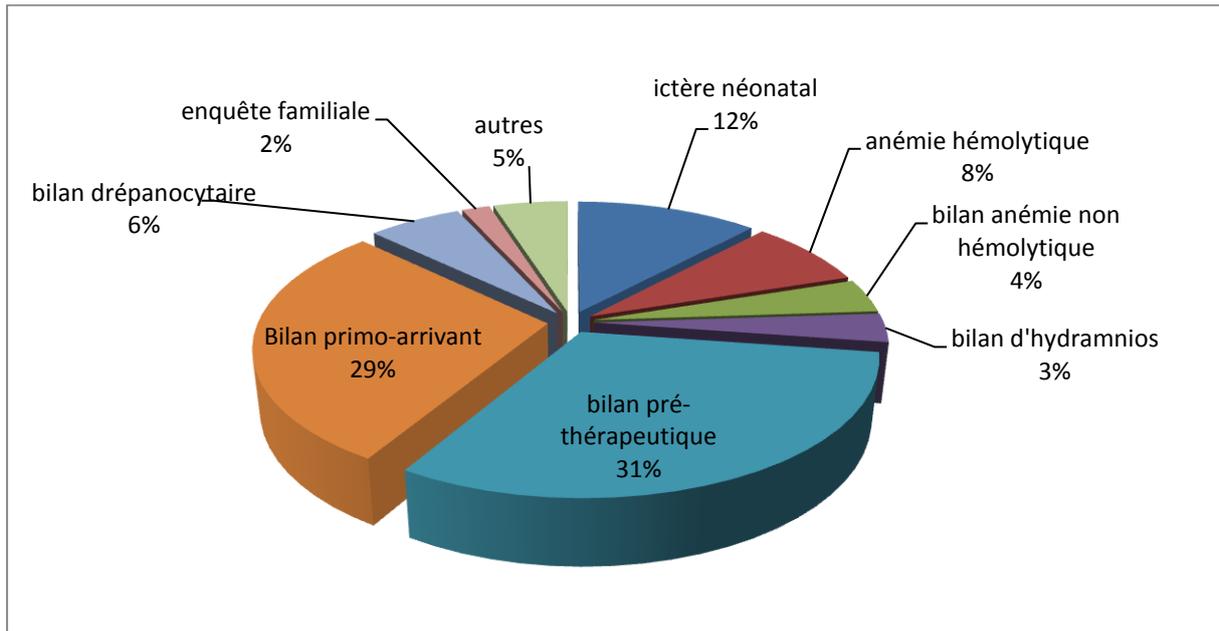


Figure 38 : Diagramme de répartition des contextes cliniques associés aux demandes de dosage de l'activité enzymatique G6PD durant la période du 1/08/17 au 31/03/18.

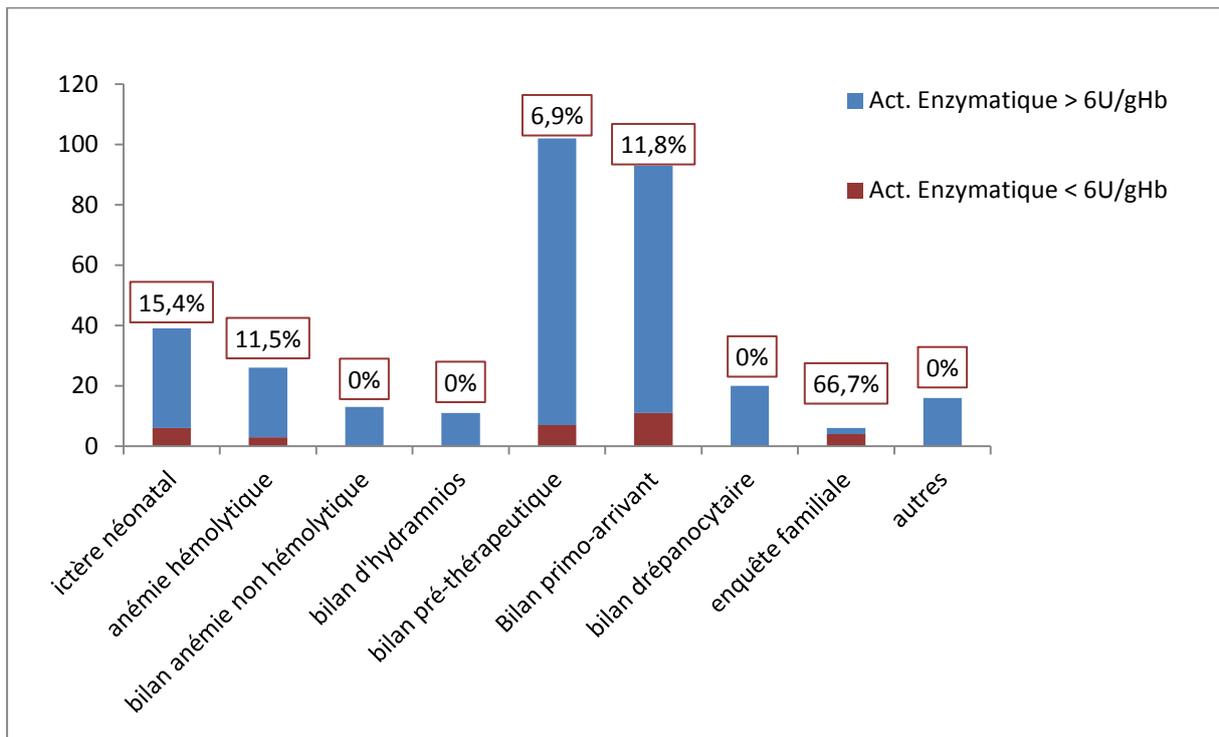


Figure 39 : Proportion de dosages ayant une activité enzymatique < 6 U/gHb en fonction du contexte clinique sur la période du 1/08/17 au 31/03/18. Les dosages de patients ayant une activité enzymatique > 6 U/gHb sont représentés en bleu, ceux de patients ayant une activité enzymatique < 6 U/gHb en rouge. Le pourcentage de dosages présentant une activité enzymatique < 6 U/gHb est indiqué dans les étiquettes encadrées en rouge.

Les principaux contextes cliniques retrouvés sont les bilans pré-thérapeutiques (31% des demandes) et les bilans systématiques proposés aux primo-arrivants en France (29% des demandes). Les bilans pré-thérapeutiques concernent essentiellement 4 médicaments :

- la Dapsone (Disulone®), indiquée en dermatologie dans le traitement des dermatoses neutrophiliques, des dermatoses bulleuses auto-immunes, mais également utilisée en traitement de deuxième intention du Purpura Thrombopénique Idiopathique (PTI).
- le Cotrimoxazole (Bactrim®), indiqué dans le traitement de la pyélonéphrite de l'enfant en relais oral, ou comme antibioprophylaxie chez les patients atteints de déficit immunitaire primitif ou secondaire (à une chimiothérapie par exemple).
- La Primaquine et la Chloroquine, indiquées toutes deux dans le traitement du paludisme à *Plasmodium non falciparum*.

La recherche d'un déficit en G6PD dans le cadre d'un ictère néonatal ou d'une anémie hémolytique représente respectivement 12% et 8% des demandes. L'exploration d'un hydramnios, pouvant être une manifestation clinique d'une anasarque foeto-placentaire dont l'une des étiologies est une maladie hémolytique du fœtus, représente moins de 5% des demandes, à l'instar des autres contextes cliniques.

Les caractéristiques en termes d'âge, de sexe et d'activité enzymatique des 30 patients ayant présenté une activité enzymatique < 6 U/gHb sur cette période sont présentées sur la Figure 40.

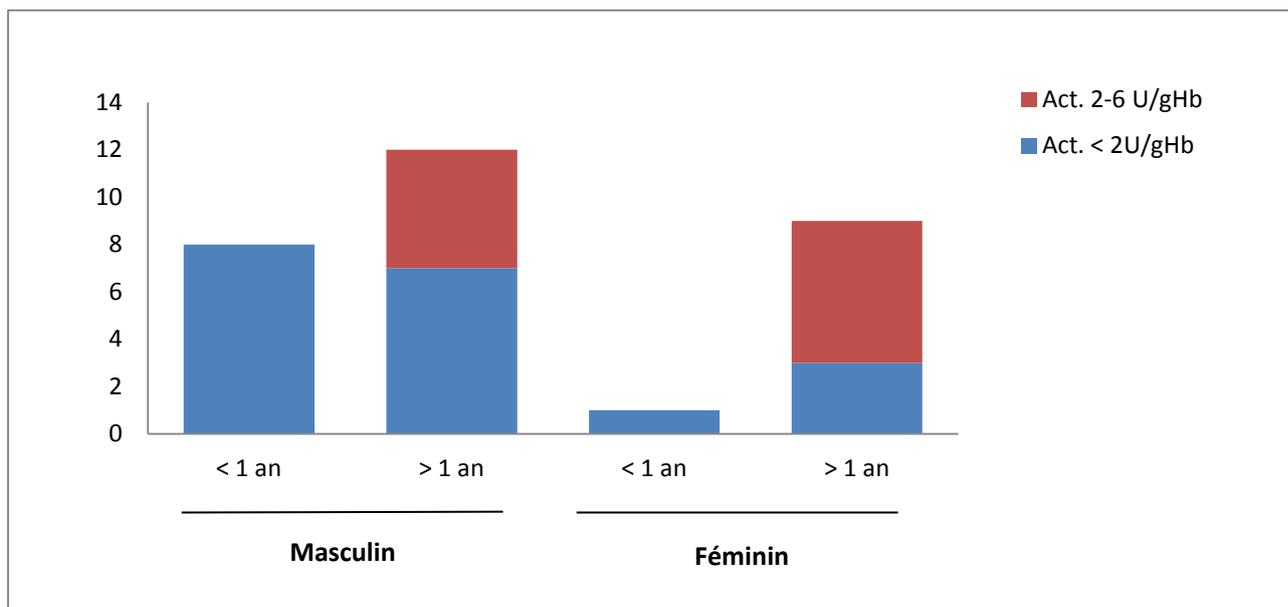


Figure 40: Représentation graphique des caractéristiques des patients ayant une activité enzymatique < 6 U/gHb sur la période du 1/08/17 au 31/03/18 en termes de sexe, d'âge et d'activité enzymatique.

La grande majorité des nouveau-nés pour lesquels un diagnostic de déficit en G6PD a été posé durant cette période est de sexe masculin (88,9%). Tous (8 garçons et 1 fille) ont présenté une activité effondrée <2 U/gHb.

Parmi les patients âgés de plus de 1 an (moyenne d'âge 33,1 ans), on compte 12 hommes (7,9%) et 10 femmes déficitaires (8,8%). 7 hommes (58,3%) et 3 femmes (30%) ont présenté une activité enzymatique effondrée (<2 U/gHb) alors que 5 hommes (41,7%) et 7 femmes (70%) ont présenté une activité comprise entre 2-6 U/gHb (moyenne : 4,6 U/gHb, min-max : 2,7-5,9 U/gHb).

Sur ces 30 patients ayant présenté une activité enzymatique < 6 U/gHb durant cette période, 9 ont bénéficié d'une analyse génétique (30%), dont 3 des 6 femmes présentant une activité enzymatique entre 2-6 U/gHb.

3) Résultats du génotypage des variants de la G6PD

La plupart des demandes d'analyse génétique ont été faites chez des patients (hommes et femmes) ayant une activité enzymatique diminuée < 6 U/gHb, des patientes suspectes d'hétérozygotie ou lors d'enquêtes familiales.

Seulement 11 patients ont bénéficié d'une analyse génétique entre juillet 2017 et mai 2018 (Tableau 13).

Tableau 13 : Résultats des analyses génétiques obtenus entre juillet 2017 et mai 2018 :

Patient	Age (années)	Sexe (M/F)	Réticulocytes (G/L)	Activité G6PD Biosentec (U/gHb)	Génétique	Origine géographique
1	10 mois	M	310	< 2	hémizygote variant Med	Espagne
2	31	F	37	8,9	hétérozygote variant Med	Espagne
3	22	F	386	< 2	variant A-: profil homozygote ou hémizygote muté	Bénin
4	16	M	76	< 2	absence de Med et A-	Bangladesh
5	16	M	36	5,5	absence de Med et A-	Bangladesh
6	52	F	83	5,0	hétérozygote A-	Bénin
7	7	F	10	3,2	hétérozygote Med	Turquie
8	31	F	65	< 2	homozygote A-	Côte d'Ivoire
9	24	F	83	2,7	hétérozygote A-	Nigéria
10	25	M	56	4	absence de Med et A-	Turquie
11	71	M	267	11,4	absence de Med et A-	Non connue

Ce faible nombre de données ne nous permet pas d'établir des conclusions fiables, mais nous pouvons tout de même constater que pour toutes les patientes présentant une activité enzymatique < 6 U/gHb, au moins un allèle variant déficitaire a été retrouvé. Les deux femmes avec une activité enzymatique effondrée < 2 U/gHb présentent des profils d'individus homozygotes ou hémizygote muté. Les 3 autres femmes ayant des activités enzymatiques comprises entre 2-6 U/gHb présentent des profils hétérozygotes pour la mutation A- ou Méditerranéenne.

A noter que la patiente 6, hétérozygote pour le variant A- est la mère de la patiente 3, présentant un profil homozygote ou hémizygote muté A-. Il n'a pas été possible de connaître le statut du père. Bien que l'activité soit légèrement diminuée chez cette mère conductrice,

elle ne présentait pas de signes cliniques de la pathologie, et son dépistage a été effectué dans le cadre d'une enquête familiale après la découverte du déficit chez sa fille.

De la même façon, la patiente 2, mère du patient 1, a bénéficié d'un dosage enzymatique et d'une analyse génétique dans le cadre d'une enquête familiale, celle-ci n'ayant jamais présenté de manifestations cliniques liées à un déficit en G6PD. Avec une activité enzymatique à 8,7 U/gHb, cette patiente illustre parfaitement la possibilité pour une femme hétérozygote d'avoir une activité enzymatique sensiblement normale et une absence de symptomatologie clinique.

Concernant les patients de sexe masculin, le profil d'hémizygote a été retrouvé comme attendu pour les patients présentant une activité enzymatique effondrée < 2 U/gHb sauf pour le patient 4 dont l'origine géographique (Bangladesh) laisse supposée un variant déficitaire différent de A- ou Med. Ceci est probablement le cas également pour les patients 5 et 10 montrant une activité diminuée bien que non effondrée, mais originaires respectivement du Bangladesh et de Turquie. Une confirmation moléculaire aurait été intéressante pour ces patients. Chez le patient 11, présentant une anémie régénérative non hémolytique d'origine indéterminée et une activité enzymatique normale, il n'a pas été retrouvé de variant Med ou A-.

PARTIE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION

Les vérifications de méthodes permettent d'apporter des preuves tangibles quant à la qualité des analyses réalisées et la fiabilité des résultats rendus. De plus, il s'agit d'un moyen efficace de maîtrise en continu des performances des méthodes en cours d'utilisation au laboratoire.

La nécessité de changement de fournisseur pour le dosage de l'activité enzymatique érythrocytaire de la G6PD nous a amené à réanalyser le processus complet du dosage et à identifier certains points critiques, notamment grâce à l'analyse de risque effectuée.

L'un des principaux changements avec la méthode Biosentec concerne l'échantillon primaire de prélèvement, qui s'effectue sur tube ACD et non plus sur tube EDTA, celui-ci n'existant pas en format pédiatrique. La population pédiatrique représentant une part importante des demandes de dosage (27%) et le volume sanguin cliniquement prélevable chez ces patients étant limité, il nous a semblé indispensable d'étudier la conformité des résultats rendus sur un faible volume d'échantillon sanguin. La validité de nos résultats en regard du seuil fixé par le laboratoire nous permet d'utiliser les tubes classiques pour les prélèvements pédiatriques, avec un volume de remplissage minimal de 1mL de sang. La consigne donnée aux services pédiatriques est de prélever un volume se rapprochant au maximum de la limite inférieure de l'étiquette présente sur le tube (correspondant à un volume de remplissage de 1,5mL de sang).

La prise en charge préanalytique a été identifiée comme une étape critique de la méthode, celle-ci comportant de nombreuses étapes manuelles avec des contraintes en termes de délai et de température de conservation importantes.

L'activité enzymatique étant rapidement dégradée si le prélèvement n'est pas conservé à +4°C, toute non-conformité concernant les conditions d'acheminement du prélèvement rendra l'interprétation d'une activité enzymatique abaissée impossible, et un nouveau prélèvement sera demandé au service.

La préparation des culots globulaires est une autre étape préanalytique critique et doit être exclusivement réalisée par des techniciens habilités. Les culots globulaires doivent être totalement déleucocytés, afin de s'affranchir d'une potentielle interférence apportée par l'activité G6PD des leucocytes, souvent supérieure à l'activité érythrocytaire en cas de déficit en G6PD.

Cette préparation doit se faire dans les 24h après le prélèvement lorsque le tube primaire est conservé à +4°C. Le laboratoire étant ouvert 7j/7 et 24h/24 et fonctionnant en effectif réduit les weekends et jours fériés, les demandes de dosage durant ces périodes sont exclusivement réservées aux demandes urgentes ne pouvant être décalées aux horaires

ouvrables (patient sortant ou nécessitant une transfusion sanguine), et ce afin de limiter le nombre de techniciens à former et d'ainsi garantir la meilleure compétence possible de ces derniers.

Concernant les résultats analytiques obtenus avec la méthode Biosentec, ces derniers sont conformes aux exigences fixées par le laboratoire en termes de répétabilité et de fidélité intermédiaire, et sont équivalents à ceux de la technique Trinity précédemment utilisée.

Cette technique permet de détecter facilement les patients normaux ou à l'inverse ceux atteints de déficit sévère à modéré en G6PD, comme en témoignent les résultats des CQE, de la comparaison de méthode et de l'analyse génétique.

Bien que conforme aux exigences fixées par le laboratoire, la variabilité analytique de cette technique de dosage mise en évidence au cours des différentes manipulations sur échantillons sanguins reste cependant non négligeable.

Elle est soulignée par le calcul de l'incertitude de mesure de la méthode, et estimée par le coefficient de variation de la fidélité intermédiaire à 16,6%.

Si cette variabilité ne pose pas de problèmes particuliers pour la détection des patients ayant une activité franchement abaissée, à savoir les hommes hémizygotés, les femmes homozygotes ou les femmes hétérozygotes avec déséquilibre important d'inactivation de l'X, elle peut être plus problématique pour la détection des patients ayant une activité enzymatique subnormale.

Une automatisation de la technique permettrait probablement de diminuer cette variabilité analytique. L'utilisation d'un spectrophotomètre thermostaté automatisé offrirait des temps d'incubation, un pipetage et une température d'analyse plus maîtrisables qu'en technique manuelle. Le laboratoire d'hématocytologie du CHU de Toulouse utilise par exemple un spectrophotomètre automatisé de type Randox Daytona pour le dosage des activités enzymatiques érythrocytaires, et obtient en effet une variabilité analytique moindre.

Concernant l'interprétation des résultats du dosage, celle-ci doit être faite avec précaution. La connaissance du contexte clinico-biologique, l'âge et le sexe du patient, le taux de réticulocytes sont autant d'éléments indispensables à l'interprétation du dosage.

Parmi les situations cliniques rendant l'interprétation du dosage enzymatique délicat, on retrouve la phase aigüe d'une hémolyse. En effet, la destruction privilégiée des globules rouges les plus déficitaires peut surestimer la valeur de l'activité enzymatique de la G6PD, en particulier pour les déficits de classe III. De même, la présence d'une forte réticulocytose peut potentiellement masquer un déficit. Il est donc fortement recommandé dans ces cas de contrôler l'activité enzymatique à distance de la crise réticulocytaire et/ou de l'hémolyse aigüe, ou bien de proposer une analyse génétique si l'urgence diagnostique ne permet pas d'attendre ou qu'une transfusion datant de moins de 3 mois rende l'interprétation du dosage impossible.

D'autres situations entraînent une surestimation de l'activité enzymatique comme l'hypochromie (observée dans la carence martiale et les thalassémies) et le très jeune âge, les nouveau-nés présentant une réticulocytose modérément élevée et une population jeune d'érythrocytes. Il est donc là aussi fortement recommandé de contrôler l'activité enzymatique à distance en cas de dosage normal.

La détection des femmes hétérozygotes reste également délicate, en raison d'une importante variabilité en termes d'activité enzymatique à la fois physiologique et analytique. En effet, en raison du phénomène de lyonisation de l'X chez la femme, la proportion de globules rouges déficitaires est plus ou moins importante selon s'il existe un déséquilibre d'inactivation en faveur du chromosome sain ou du chromosome muté. La mesure de l'activité rapportée par gramme d'hémoglobine donne un résultat reflétant l'importance relative des populations d'hématies saines et déficientes chez le sujet étudié. Elle peut ainsi être très variable, allant d'une activité comparable à celle des hommes hémizygotés à une activité complètement normale (96).

Il est donc important d'informer les cliniciens qu'un résultat normal d'activité enzymatique n'exclut pas la présence d'un statut hétérozygote pour le déficit en G6PD, et de proposer une analyse génétique pour les patientes présentant un résultat subnormal ou une forte suspicion d'hétérozygotie.

La criticité du dépistage des femmes hétérozygotes est toutefois à relativiser.

Le risque hémolytique chez ces dernières est limité, concernant essentiellement les femmes ayant une activité enzymatique franchement abaissée, et les principes de prévention ne sont obligatoires que chez ces dernières ou chez les femmes enceintes ou allaitantes (1).

L'intérêt du dépistage de ces femmes conductrices réside donc principalement dans le cadre du conseil génétique, de l'information quant au risque de transmettre la pathologie à leurs enfants de sexe masculin et de la prévention chez les femmes enceintes ou allaitantes d'enfants potentiellement déficitaires.

Une aide à l'interprétation des dosages, de façon générale, peut être de comparer le résultat obtenu à celui d'un témoin non déficitaire de même tranche d'âge et ayant un taux de réticulocytes équivalent passé dans la même série de dosage. La comparaison des résultats nous permet de suspecter un déficit en cas d'activité franchement abaissée du patient par rapport à celui du témoin.

En parallèle et de façon complémentaire, des intervalles de références ont été établis en fonction de l'âge et du nombre de réticulocytes à partir d'un échantillon de patients non déficitaires et après exclusion des patients présentant une carence martiale.

La borne inférieure de ces intervalles étant supérieure à la valeur seuil de 6 U/gHb établie par le fournisseur, ils nous permettent de définir une zone grise dans laquelle une diminution d'activité enzymatique par rapport à la population témoin peut laisser suspecter soit une dégradation de l'activité enzymatique (causes préanalytiques ou analytiques) soit

une hétérozygotie chez les femmes. En fonction du sexe et du contexte clinico-biologique, un contrôle de l'activité enzymatique sur un nouveau prélèvement ou une analyse génétique peut alors être conseillé chez ces patients présentant des résultats compris dans cette zone grise.

Une autre approche, recommandée par les experts, consiste à comparer l'activité G6PD à celle d'une autre enzyme érythrocytaire sensible à l'âge cellulaire comme la pyruvate kinase (PK) ou l'hexokinase (77) pour un même patient et dans un même échantillon.

La PK et l'hexokinase, enzymes érythrocytaires participant à la glycolyse, possèdent comme la G6PD une activité augmentée chez les jeunes érythrocytes et peuvent ainsi servir de témoin interne (97).

Les déficits en pyruvate kinase ou en hexokinase se transmettent de façon autosomique récessive et sont beaucoup moins fréquents que le déficit en G6PD (prévalence respective de 1-9/100 000 et <1/1 000 000). Leur association avec ce dernier est donc peu probable voire très peu probable pour l'hexokinase.

Le dosage de l'activité enzymatique du pyruvate kinase et de l'hexokinase se réalise de façon similaire à celui de la G6PD, comprenant les mêmes étapes préanalytiques. Leur dosage, en parallèle de celui de la G6PD, permettrait d'établir des ratios G6PD/PK et G6PD/hexokinase. En cas de déficit en G6PD, ces ratios seraient fortement abaissés, même en cas de forte réticulocytose ou d'hypochromie associée.

Le ratio G6PD/PK a été étudié, par exemple, par l'équipe de Tagarelli *et al.* dans la région de Calabre en Italie qui présente une fréquence élevée de déficit en G6PD et de trait thalassémique. L'utilisation du ratio G6PD/PK leur a permis de mieux identifier les patientes hétérozygotes pour le déficit en G6PD à la fois dans le groupe des femmes ayant une NFS normale et dans celui des femmes présentant une anémie microcytaire, qu'elle soit causée par une carence martiale ou un trait bêta-thalassémique. Le ratio chez ces personnes était en effet significativement inférieur à celui des patients normaux ($p < 0,001$) (98).

La mise en place de ces dosages au laboratoire apparaît donc primordiale, et ce d'autant plus que le fournisseur Biosentec, contrairement à Trinity, propose des réactifs avec marquage CE au moins pour le dosage de la pyruvate kinase.

Le dosage de l'activité enzymatique de la G6PD par les réactifs Biosentec a été mis en place au CHU de Pellegrin depuis août 2017. L'extraction de l'activité réalisée sur 8 mois donne une cartographie des prescriptions et des résultats des dosages au CHU de Bordeaux.

La réalisation du dosage chez les nouveau-nés présentant un ictère a permis de mettre en évidence un déficit chez 20 % des patients de sexe masculin et chez 7,1% des patients de sexe féminin. Le contrôle d'activité à distance préconisé chez les nouveau-nés avec une activité enzymatique normale a rarement été réalisé au CHU. Il peut cependant avoir été fait dans un autre laboratoire ou en dehors de la période d'extraction des données, ne nous

permettant pas de savoir si une absence de déficit lors du dosage néonatal a été rendue à tort.

En contexte préthérapeutique, un déficit a été mis en évidence chez 6,9% des patients, engendrant une potentielle modification de la prise en charge thérapeutique chez ces patients.

3 patients ayant bénéficié d'un dosage dans le cadre d'un éventuel traitement par Disulone (Dapsone®) ont présenté une activité enzymatique abaissée. L'un de ces patients, présentant une activité enzymatique effondrée (<2 U/gHb), a tout de même reçu un traitement par Disulone mais à demi-dose (50mg/j) sans qu'aucune crise d'anémie hémolytique n'ait été objectivée.

Un patient ayant présenté une activité enzymatique diminuée (5,4 U/gHb) dans un contexte de paludisme à *Plasmodium ovale* a bénéficié d'un traitement par Primaquine selon un schéma thérapeutique intermittent préconisé par l'OMS (99), à savoir une posologie de 0,75 mg/kg 1 fois par semaine pendant 8 semaines au lieu du schéma classique de 0,25-0,5 mg/kg/jour pendant 14 jours. Cette prise en charge est recommandée chez les patients ne présentant pas de variant sévère du déficit en G6PD et se déroule sous supervision médicale étroite afin de surveiller l'apparition éventuelle d'une hémolyse.

Le déficit est retrouvé assez fréquemment dans le dépistage systématique réalisé dans la population des primo-arrivants (11,8%), alors qu'aucun déficitaire n'a été retrouvé chez les patients atteints de syndrome drépanocytaire majeur au cours de cette période. Les données de la littérature rapportent pourtant 15% de patients SS déficitaires en G6PD (100). Le bilan réalisé sur les patients primo-arrivants comporte un dépistage des hémoglobinopathies par électrophorèse de l'hémoglobine. Le statut drépanocytaire ou non de ces patients, non connu lors du dosage de l'activité enzymatique de la G6PD, n'a pas été pris en compte dans l'extraction réalisée, constituant un potentiel biais qui pourrait expliquer en partie cette différence.

En conclusion, la méthode de dosage de l'activité enzymatique de la G6PD avec les réactifs Biosentec est comparable à celle utilisant les réactifs Trinity et répond aux exigences fixées par le laboratoire. Le changement de réactif est effectif depuis août 2017 au CHU de Bordeaux. Cette nouvelle méthode impose un prélèvement différent et un traitement préanalytique moins confortable pour les équipes de soins et techniques mais offre la possibilité d'élargir notre panel érythrocytaire, ce qui devrait faciliter l'interprétation biologique des résultats des dosages en plus de pouvoir diagnostiquer d'éventuels déficits en pyruvate kinase, actuellement envoyés au Centre de référence à l'hôpital Mondor.

BIBLIOGRAPHIE

1. HAS. Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) Déficit en G6PD ou Favisme. 2017.
2. Meletis J, Konstantopoulos K. Favism - From the « avoid fava beans » of Pythagoras to the present. *Haema* 7 1 17-21 2004. 1 mars 2004;7:17.
3. J. Bancarel, Causse-Le-Dorze P, Traccard C. Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase: intérêt du dépistage systématique dans les forces armées. *Medecine et armées*. 2010;125-30.
4. Beutler E. The hemolytic effect of primaquine and related compounds: a review. *Blood*. févr 1959;14(2):103-39.
5. Wajcman H, Galactéros F. Le déficit en glucose-6 phosphate déshydrogénase : protection contre le paludisme et risque d'accidents hémolytiques. *C R Biol*. août 2004;327(8):711-20.
6. Alving AS, Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science*. 14 sept 1956;124(3220):484-5.
7. Naylor CE, Rowland P, Basak AK, Gover S, Mason PJ, Bautista JM, et al. Glucose 6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme. *Blood*. 1 avr 1996;87(7):2974-82.
8. Au SW, Gover S, Lam VM, Adams MJ. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Struct Lond Engl* 1993. 15 mars 2000;8(3):293-303.
9. 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*. mai 2009;42(3):267-78.
10. Cappellini M, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The Lancet*. janv 2008;371(9606):64-74.
11. Oppenheim A, Jury CL, Rund D, Vulliamy TJ, Luzzatto L. G6PD Mediterranean accounts for the high prevalence of G6PD deficiency in Kurdish Jews. *Hum Genet*. avr 1993;91(3):293-4.
12. Verlé P, Nhan DH, Tinh TT, Uyen TT, Thuong ND, Kongs A, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in northern Vietnam. *Trop Med Int Health TM IH*. mars 2000;5(3):203-6.
13. Al-Riyami A, Ebrahim GJ. Genetic Blood Disorders Survey in the Sultanate of Oman. *J Trop Pediatr*. juill 2003;49 Suppl 1:i1-20.
14. Ouattara AK, Yameogo P, Traore L, Diarra B, Assih M, Compaore TR, et al. Prevalence, genetic variants and clinical implications of G-6-PD deficiency in Burkina Faso: a systematic review. *BMC Med Genet [Internet]*. déc 2017 [cité 2 juill 2018];18(1). Disponible sur: <https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12881-017-0496-2>

15. Jolly D, Lévy É. Le Déficit en G6PD : Arguments épidémiologiques et socio-économiques en faveur de la nécessité d'un dépistage systématique ciblé. *J Gest Déconomie Médicales*. 2010;28(1):19.
16. Mehta A, Mason PJ, Vulliamy TJ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. mars 2000;13(1):21-38.
17. Gilles HM, Fletcher KA, Hendrickse RG, Lindner R, Reddy S, Allan N. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, sickling, and malaria in African children in South Western Nigeria. *Lancet Lond Engl*. 21 janv 1967;1(7482):138-40.
18. Allison AC, Clyde DF. Malaria in African children with deficient erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Br Med J*. 13 mai 1961;1(5236):1346-9.
19. Bienzle U, Ayeni O, Lucas AO, Luzzatto L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria. Greater resistance of females heterozygous for enzyme deficiency and of males with non-deficient variant. *Lancet Lond Engl*. 15 janv 1972;1(7742):107-10.
20. Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SNR, Kwiatkowski D, Gupta S, et al. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature*. juill 1995;376(6537):246-9.
21. Williams TN, Mwangi TW, Wambua S, Alexander ND, Kortok M, Snow RW, et al. Sick Cell Trait and the Risk of Plasmodium falciparum Malaria and Other Childhood Diseases. *J Infect Dis*. juill 2005;192(1):178-86.
22. Luzzatto L, Sodeinde O, Martini G. Genetic variation in the host and adaptive phenomena in Plasmodium falciparum infection. *Ciba Found Symp*. 1983;94:159-73.
23. Luzzatto L, Usanga FA, Reddy S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science*. 16 mai 1969;164(3881):839-42.
24. Atamna H, Pascarmona G, Ginsburg H. Hexose-monophosphate shunt activity in intact Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and in free parasites. *Mol Biochem Parasitol*. sept 1994;67(1):79-89.
25. Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E, Turrini F, Mannu F, Ulliers D, et al. Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by Plasmodium falciparum may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood*. 1 oct 1998;92(7):2527-34.
26. NetHealthBook.com (R. Schilling). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency (G6PD deficiency),. 2017.
27. WHO Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ*. 1989;67(6):601-11.
28. Wajcman H, Galactéros F. Le déficit en glucose-6 phosphate déshydrogénase : protection contre le paludisme et risque d'accidents hémolytiques. *C R Biol*. août 2004;327(8):711-20.

29. Au SW, Gover S, Lam VM, Adams MJ. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP + molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*. mars 2000;8(3):293-303.
30. Kirkman HN, Hendrickson EM. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes. *J Biol Chem*. 7 janv 1962;237(7):2371-6.
31. Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev*. sept 2007;21(5):267-83.
32. Roos D, Pronk-Admiraal CJ, Ploem JE, Mason PJ, Bautista JM, Khan PM, et al. Molecular Basis and Enzymatic Properties of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Volendam, Leading to Chronic Nonspherocytic Anemia, Granulocyte Dysfunction, and Increased Susceptibility to Infections. :9.
33. Au W-Y, Ma ESK, Lam VMS, Chan JLC, Pang A, Kwong Y-L. Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in elderly Chinese women heterozygous for G6PD variants. *Am J Med Genet A*. 30 août 2004;129A(2):208-11.
34. Vulliamy T, Luzzatto L, Hirono A, Beutler E. Hematologically Important Mutations: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Blood Cells*. 1997;12.
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 [Internet]*. 9 déc 2016 [cité 8 mai 2018];17(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187869/>
36. Minucci A, Moradkhani K, Hwang MJ, Zuppi C, Giardina B, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: Review of the “old” and update of the new mutations. *Blood Cells Mol Dis*. mars 2012;48(3):154-65.
37. Megarbane B. Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase : quand y penser et quelles précautions prendre ? *Réanimation*. juin 2008;17(4):399-406.
38. Vulliamy TJ, D’Urso M, Battistuzzi G, Estrada M, Foulkes NS, Martini G, et al. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. juill 1988;85(14):5171-5.
39. Gómez-Gallego F, Garrido-Pertierra A, Bautista JM. Structural Defects Underlying Protein Dysfunction in Human Glucose-6-phosphate Dehydrogenase A- Deficiency. *J Biol Chem*. 31 mars 2000;275(13):9256-62.
40. Vives-Corróns JL, Kuhl W, Pujades MA, Beutler E. Molecular genetics of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) Mediterranean variant and description of a new G6PD mutant, G6PD Andalus1361A. *Am J Hum Genet*. sept 1990;47(3):575-9.
41. Longo L, Vanegas OC, Patel M, Rosti V, Li H, Waka J, et al. Maternally transmitted severe glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency is an embryonic lethal. 2002;11.
42. Notaro R, Afolayan A, Luzzatto L. Human mutations in glucose 6-phosphate dehydrogenase reflect evolutionary history. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. mars 2000;14(3):485-94.

43. Vulliamy TJ, Kaeda JS, Ait-Chafa D, Mangerini R, Roper D, Barbot J, et al. Clinical and haematological consequences of recurrent G6PD mutations and a single new mutation causing chronic nonspherocytic haemolytic anaemia. *Br J Haematol.* 101(4):670-5.
44. Johnson LH, Bhutani VK, Brown AK. System-based approach to management of neonatal jaundice and prevention of kernicterus. *J Pediatr.* avr 2002;140(4):396-403.
45. 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.* juill 1999;104(1 Pt 1):68-74.
46. Kaplan M, Waisman D, Mazor D, Hammerman C, Bader D, Abrahamov A, et al. Effect of vitamin K1 on glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient neonatal erythrocytes in vitro. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* nov 1998;79(3):F218-220.
47. Kaplan M, Hammerman C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and severe neonatal hyperbilirubinemia: a complexity of interactions between genes and environment. *Semin Fetal Neonatal Med.* juin 2010;15(3):148-56.
48. Kaplan M, Rubaltelli FF, Hammerman C, Vilei MT, Leiter C, Abramov A, et al. Conjugated bilirubin in neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Pediatr.* mai 1996;128(5 Pt 1):695-7.
49. Kaplan M, Renbaum P, Levy-Lahad E, Hammerman C, Lahad A, Beutler E. Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 oct 1997;94(22):12128-32.
50. Favism and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *N Engl J Med.* 15 mars 2018;378(11):1067-9.
51. SPILF. Prise en charge et prévention du paludisme d'importation. Mise à jour 2017 des RPC 2007. 2017.
52. Ali NA, al-Naama LM, Khalid LO. Haemolytic potential of three chemotherapeutic agents and aspirin in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *East Mediterr Health J Rev Sante Mediterr Orient Al-Majallah Al-Sihhiyah Li-Sharq Al-Mutawassit.* mai 1999;5(3):457-64.
53. Altikat S, Çiftçi M, Büyükokuro ME. IN VITRO EFFECTS OF SOME ANESTHETIC DRUGS ON ENZYMATIC ACTIVITY OF HUMAN RED BLOOD CELL GLUCOSE 6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE. *Pol J Pharmacol.* 2002;5.
54. Siddiqui T, Khan AH. Hepatitis A and cytomegalovirus infection precipitating acute hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Mil Med.* juin 1998;163(6):434-5.
55. Tugwell P. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in Nigerians with jaundice associated with lobar pneumonia. *Lancet Lond Engl.* 5 mai 1973;1(7810):968-9.
56. Fiorelli G, Martinez di Montemuros F, Cappellini MD. Chronic non-spherocytic haemolytic disorders associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Best Pract Res Clin Haematol.* mars 2000;13(1):39-55.

57. Beutler E, Mathai CK, Smith JE. Biochemical Variants of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Giving Rise to Congenital Nonspherocytic Hemolytic Disease. *Blood*. 1 févr 1968;31(2):131-50.
58. Chan TK, Chan WC, Weed RI. Erythrocyte hemighosts: a hallmark of severe oxidative injury in vivo. *Br J Haematol*. avr 1982;50(4):575-82.
59. Ward PC, Schwartz BS, White JG. Heinz-body anemia: « bite cell » variant--a light and electron microscopic study. *Am J Hematol*. sept 1983;15(2):135-46.
60. Roelens M, Dossier C, Fenneteau O, Couque N, Costa LD. Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase : de l'importance de la cytologie. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1 mai 2016;74(3):299-305.
61. Domingo GJ, Satyagraha AW, Anvikar A, Baird K, Bancone G, Bansil P, et al. G6PD testing in support of treatment and elimination of malaria: recommendations for evaluation of G6PD tests. *Malar J*. 4 nov 2013;12:391.
62. Beutler E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. 3rd edn. New York: Grune and Stratton; 1984.
63. Genève: Organisation Mondiale de la Santé. Dépistage du déficit en G6PD pour une utilisation sans risque de la primaquine dans le traitement radical du paludisme à *P. vivax* ou *P. ovale*. Note d'orientation. 2017;31.
64. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, Löhr GW, Ramot B, Valentine WN. International Committee for Standardization in Haematology: recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *Br J Haematol*. nov 1979;43(3):465-7.
65. A guide to fluorescent spot testing for G6PD deficiency. Seattle Programme for Appropriate Technology in Health; 2014.
66. Ley B, Bancone G, von Seidlein L, Thriemer K, Richards JS, Domingo GJ, et al. Methods for the field evaluation of quantitative G6PD diagnostics: a review. *Malar J*. 11 sept 2017;16(1):361.
67. Baird JK. Point-of-care G6PD diagnostics for *Plasmodium vivax* malaria is a clinical and public health urgency. *BMC Med* [Internet]. 14 déc 2015 [cité 19 mai 2018];13. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4677444/>
68. Ainoon O, Alawiyah A, Yu YH, Cheong SK, Hamidah NH, Boo NY, et al. Semiquantitative screening test for G6PD deficiency detects severe deficiency but misses a substantial proportion of partially-deficient females. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. juin 2003;34(2):405-14.
69. Kim S, Nguon C, Guillard B, Duong S, Chy S, Sum S, et al. Performance of the CareStart™ G6PD Deficiency Screening Test, a Point-of-Care Diagnostic for Primaquine Therapy Screening. *PLoS ONE* [Internet]. 2 déc 2011 [cité 19 mai 2018];6(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3229584/>
70. WHO. *In vitro diagnosis medical devices to identify G6PD activity*. 2016.

71. Reclos GJ, Hatzidakis CJ, Schulpis KH. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency neonatal screening: preliminary evidence that a high percentage of partially deficient female neonates are missed during routine screening. *J Med Screen*. 2000;7(1):46-51.
72. von Seidlein L, Auburn S, Espino F, Shanks D, Cheng Q, McCarthy J, et al. Review of key knowledge gaps in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency detection with regard to the safe clinical deployment of 8-aminoquinoline treatment regimens: a workshop report. *Malar J*. 27 mars 2013;12:112.
73. Chu CS, White NJ. Management of relapsing *Plasmodium vivax* malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2 oct 2016;14(10):885-900.
74. Jonges GN, Hagen H, Van Noorden CJ, Weening RS, Roos D. Comparison between the chromate inhibition test and a cytochemical method for the determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in erythrocytes. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 15 mai 1989;181(2):135-41.
75. Peters AL, Veldthuis M, van Leeuwen K, Bossuyt PMM, Vlaar APJ, van Bruggen R, et al. Comparison of Spectrophotometry, Chromate Inhibition, and Cytofluorometry Versus Gene Sequencing for Detection of Heterozygously Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-Deficient Females. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. nov 2017;65(11):627-36.
76. Shah SS, Diakite SAS, Traore K, Diakite M, Kwiatkowski DP, Rockett KA, et al. A novel cytofluorometric assay for the detection and quantification of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Sci Rep [Internet]*. déc 2012 [cité 7 juill 2018];2(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/srep00299>
77. Beutler E. Déficit en G6PD : pathologie moléculaire. *Hématologie*. oct 1995;1(5):385-92.
78. Mosca A, Paderi M, Sanna A, Paleari R, Cao A, Galanello R. Preliminary experience with the differential pH technique for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) measurement in whole blood: application to an area with high prevalence of thalassaemia and G6PD deficiency. *Haematologica*. août 1990;75(4):397-9.
79. Corash L, Spielberg S, Bartsocas C, Boxer L, Steinherz R, Sheetz M, et al. Reduced Chronic Hemolysis during High-Dose Vitamin E Administration in Mediterranean-Type Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *N Engl J Med*. 21 août 1980;303(8):416-20.
80. Sultana N, Begum N, Begum S, Ferdousi S, Ali T. Effects of vitamin E supplementation on some aspects of hematological variables in patients of hemolytic anemia with glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. *Bangladesh J Physiol Pharmacol [Internet]*. 20 oct 2009 [cité 21 mai 2018];22(1). Disponible sur: <http://www.banglajol.info/index.php/BJPP/article/view/3563>
81. ANSM. Liste des substances actives des médicaments pouvant provoquer un accident hémolytique chez les personnes atteintes de déficit en G6PD. 2013.
82. Leong A. Is There a Need for Neonatal Screening of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Canada? 2007;4.

83. Joseph R, Ho LY, Gomez JM, Rajdurai VS, Sivasankaran S, Yip YY. Mass newborn screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Singapore. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999;30 Suppl 2:70-1.
84. AFNOR. NF EN ISO 9000-Systèmes de management de la qualité-Principes essentiels et vocabulaire. 2005.
85. Cofrac. SH GTA 04-Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) /validation (portée B) des méthodes en biologie médicale (révision 01). 2015.
86. Afnor. NF EN ISO 15189. 2012.
87. Cofrac. SH GTA 06-Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale (révision 00). 2012.
88. Cofrac. SH FORM 43- Fiche quantitatif - Vérification (portée A)/Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale (révision 00). 2015.
89. Cofrac. SH GTA 14 - Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale (révision 00).
90. Biosentec. G6PD Biosentec Ref.64CE Notice réactif v14501. 2014.
91. Ricos C. et al. Desirable Biological Variation Database specifications. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.
92. Melet L, Chaigneau C, Lefevre-Pettazoni M. Étude des performances analytiques d'un automate d'hématologie (Advia[®] 2120 i Siemens) et apport sur la pratique quotidienne. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1 nov 2013;71(6):679-91.
93. Vassault A, Grafmeyer D, de Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. [Quality specifications and allowable standards for validation of methods used in clinical biochemistry]. *Ann Biol Clin (Paris)*. déc 1999;57(6):685-95.
94. Journois D. Concordance de deux variables : l'approche graphique. [/data/revues/07618425/00210001/127/](http://www.em-consulte.com/en/article/144170) [Internet]. 17 avr 2008 [cité 26 mai 2018]; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/en/article/144170>
95. Kaplan L, Pesce A, Kazmierczak S. *Clinical chemistry: theory, analysis, correlation*. 4^e éd. St Louis; 2003.
96. Wang J, Xiao Q-Z, Chen Y-M, Yi S, Liu D, Liu Y-H, et al. DNA hypermethylation and X chromosome inactivation are major determinants of phenotypic variation in women heterozygous for G6PD mutations. *Blood Cells Mol Dis*. déc 2014;53(4):241-5.
97. Beutler E. How do red cell enzymes age? A new perspective. *Br J Haematol*. nov 1985;61(3):377-84.
98. 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*. oct 2004;37(10):863-6.

99. OMS. Dépistage du déficit en G6PD pour une utilisation sans risque de la primaquine dans le traitement radical du paludisme à *P. vivax* ou *P. ovale*. 2017.
100. Joly P, Garnier N, Kebaili K, Renoux C, Dony A, Cheikh N, et al. G6PD deficiency and absence of α -thalassemia increase the risk for cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. *Eur J Haematol.* avr 2016;96(4):404-8.

ANNEXES

Annexe I: Liste des substances actives (classes par ordre alphabétique) des médicaments pouvant provoquer un accident hémolytique chez les personnes atteintes de déficit en G6PD, ANSM 2013 (81)



Les médicaments contre-indiqués



Les médicaments qui peuvent être utilisés, sous réserve que la posologie soit strictement respectée



Les médicaments déconseillés



Acide acétylsalicylique (Aspirine)		Noramidopyrine (Métamizole sodique) ^{SS}	
Acide ascorbique (Vitamine C)		Norfloxacine (voie orale)	
Acide nalidixique^S		Ofloxacine (voies orale et injectable)	
Acide pipémidique		Paracétamol	
Antipyrine (voir Phénazone)		Péfloxacine	
Aspirine (voir Acide acétylsalicylique)		Phénazone (voies cutanée et nasale)	
Bleu de méthylène (voie injectable)*		Phytoménadione (voir Vitamine K)	
Carbutamide ^S		Prilocaine	
Chloroquine		Primaquine*	
Ciprofloxacine		Quinine	
Dapsone		Rasburicase	
Dimercaprol		Spiramycine	
Enoxacine		Streptokinase*	
Fluméquine		Sulfacétamide ^{SS}	
Glibenclamide		Sulfadiazine (voie orale)	
Glibornuride ^{SS}		Sulfadiazine (voie cutanée)	
Gliclazide		Sulfadoxine	
Glimépiride		Sulfafurazole	
Glipizide		Sulfaguanidine^S	
Hydroxychloroquine		Sulfaméthizol	
Lévofloxacine		Sulfaméthoxazole	
Loméfloxacine		Sulfasalazine	
Métamizole sodique (voir Noramidopyrine)^{SS}		Triméthoprime	
Moxifloxacine		Vitamine C (voir Acide ascorbique)	
Nitrofurantoïne		Vitamine K ₁ (Phytoménadione)	

* Substances actives qui ne figuraient pas dans la liste de 2008

^S Substances actives non disponibles sur le marché français

^{SS} Substances actives non disponibles sur le marché français et sans autorisation de mise sur le marché en France

Annexe II : Analyse des risques pour le dosage de l'activité enzymatique de la G6PD par méthode Biosentec

Etape	Elément défaillant	Risque / événement redouté / mode de défaillance (AMDEC)	Causes (F)	Effets (G)	G	F	D	ICR	Moyens de maîtrise existants (D)	N°
Prélèvement	Main d'œuvre	Oubli d'identification du prélèvement	erreur humaine	retard à la prise en charge	2	2	2	8	Contrôle à la réception (Formation ABC)	1
	Main d'œuvre	erreur d'identité	discordance étiquette bon/prélèvement	résultat erroné pour le patient	5	2	2	20	Contrôle à la réception (Formation ABC)	2
	Main d'œuvre	erreur d'identité	mauvais patient prélevé (erreur d'étiquetage du tube primaire)	résultat erroné pour le patient	5	1	5	25	Vérification concordance avec antécédents (si disponibles) et contexte clinique	3
	Main d'œuvre	Nature de l'échantillon non conforme	Mauvaise lecture du bon de demande ou catalogue des actes	Analyse non réalisée	3	1	1	3	https://catalogue-biologiepathologie.chu-bordeaux.fr/IN-LAB-16-2010 Information des préleveurs Formation du personnel (contrôle à la réception)	4
	Main d'œuvre	Quantité insuffisante	difficulté de prélèvement	Analyse impossible à réaliser	3	1	1	3	Manuel de prélèvement	5
	Main d'œuvre	Tube inadapté	Manque de formation /information des préleveurs, Réapprovisionnement insuffisant de tubes adéquats	Analyse non réalisable	3	4	1	12	Catalogue des actes Information des préleveurs (Note d'information aux prescripteurs bimestrielle sur les changement de conditions préanalytiques mise en place par le pôle de biologie)	6
	Matériel	Quantité insuffisante	Tube insuffisamment rempli	Volume insuffisant pour contrôle des résultats si besoin	3	1	1	3	Catalogue des actes Formation des préleveurs Contrôle à la réception	7
	Matériel	Tube périmé	Mauvaise gestion du stock	Modification potentielle de l'activité enzymatique	4	2	1	8	Vérification date de préparation à réception Formation du personnel MO_LAB_17_2816	8
Enregistrement échantillon	Main d'œuvre	Erreur d'étiquetage tube primaire	Inattention	Résultats non-conformes	5	2	2	20	Vérification manuelle de la concordance entre étiquette primaire et étiquette de travail et concordance entre bon de prescription et enregistrement des examens	9
	Méthode	perte échantillon	échantillons placés à un endroit inadapté	retard dans la prise en charge	4	1	1	4	Formation du personnel	10
	Méthode	perte échantillon	échantillons mal aiguillés envoyés dans un autre service	retard dans la prise en charge	4	1	1	4	Formation du personnel	11
	Matériel	changement de nom du patient (nouveau né)	risque de dossier non lié sur l'informatique	retard dans la prise en charge	3	1	1	3	comparaison date de naissance; numéro sigma	12

Etape	Elément défaillant	Risque / événement redouté / mode de défaillance (AMDEC)	Causes (F)	Effets (G)	G	F	D	ICR	Moyens de maîtrise existants (D)	N°
Acheminement du prélèvement	Main d'œuvre	Mauvaise température d'acheminement	Manque d'information du personnel préleveur	Modification potentielle de l'activité enzymatique	4	3	2	24	Catalogue des actes Information des préleveurs (Note d'information aux prescripteurs bimestrielle sur les changement de conditions préanalytiques mise en place par le pôle de biologie) Contrôle à la réception	13
	Main d'œuvre	Délai > 24h avant prise en charge analytique ou heure de prélèvement manquante	Oubli du tube dans le service	Modification potentielle de l'activité enzymatique	4	2	2	16	Catalogue des actes Formation des préleveurs (Note d'information aux prescripteurs bimestrielle sur les changement de conditions préanalytiques mise en place par le pôle de biologie) Contrôle à la réception	14
	Main d'œuvre	Délai > 24h avant prise en charge analytique	Délai trop long entre réception du tube et préparation des culots globulaires	Modification potentielle de l'activité enzymatique	4	2	2	16	Formation/habilitation du personnel Mode opératoire MO_LAB_17_2816	15
	Matériel	Déversement du tube (tubes ouverts)	Mauvais rebouchage du tube	Analyse non réalisable	4	1	1	4	Sensibilisation des préleveurs Contrôle à la réception	16
Conservation des échantillons	Main d'œuvre	Mauvaise température de conservation des échantillons	Mauvaise formation du personnel	Analyse non réalisable	3	1	1	3	Formation/habilitation du personnel Mode opératoire MO_LAB_17_2816	17
	Matériel	Mauvaise température de conservation des échantillons	Problème métrologique	Analyse non réalisable	3	1	2	6	Enregistrement métrologiques	18

Etape	Élément défaillant	Risque / événement redouté / mode de défaillance (AMDEC)	Causes (F)	Effets (G)	G	F	D	ICR	Moyens de maîtrise existants (D)	N°
Préparation des culots globulaires	Main d'œuvre	Erreur lors de la manipulation (vitesse / température de centrifugation, température, volume utilisés)	Mauvaise formation du personnel, surcharge de travail	Modification potentielle de l'activité enzymatique	4	2	4	32	Formation/habilitation du personnel Mode opératoire MO_LAB_17_2816 Contrôle des centrifugeuses	19
	Main d'œuvre	Erreur dans l'étiquetage des culots globulaires	erreur humaine, surcharge de travail	résultat erroné pour le patient	5	1	4	20	Comparaison avec antécédents (si présente), contexte clinico-biologique	20
	Matériel	Centrifugeuse hors service	panne/maintenance/entretien	retard dans la prise en charge	2	1	1	2	Utilisation d'une autre centrifugeuse	21
	Matériel	Mauvaise température de conservation des culots globulaires	Problème métrologique	Analyse non réalisable	3	1	1	3	Enregistrement métrologiques	22
	Main d'œuvre	Tube coagulé	Mauvaise homogénéisation du tube, difficulté de prélèvement	Volume insuffisant pour contrôle des résultats si besoin	3	2	1	6	Formation des préleveurs Contrôle à réception MO_LAB_17_2816	23
Analyse	Main d'œuvre	Mauvaise préparation de l'hémolysat	Problème de centrifugation, oubli de vortex pour la lyse des globules rouges	Modification potentielle de l'activité enzymatique	4	2	4	32	Formation/habilitation du personnel Mode opératoire MO_LAB_17_2816 Contrôle des centrifugeuses	24
	Main d'œuvre	Mauvaise préparation du mélange réactionnel	Erreur/oubli de dépôt réactifs ou hémolysât	Modification potentielle de l'activité enzymatique	4	2	4	32	Formation/habilitation du personnel Mode opératoire MO_LAB_17_2816	25
	Main d'œuvre	Mauvaise utilisation du spectrophotomètre	Défaut de formation du personnel	Modification potentielle de l'activité enzymatique	4	2	4	32	Formation/habilitation du personnel Mode opératoire MO_LAB_17_2816 Résultats des CIQ	26
	Matériel	Résultats erronés	Défaut de précision des pipettes	Modification potentielle de l'activité enzymatique	4	2	2	16	Métrologie des pipettes Résultats des CQI	27
	Matériel	Résultats erronés	Dysfonctionnement de l'enceinte thermostatée	Modification potentielle de l'activité enzymatique	4	2	2	16	CQI encadrant chaque série Vérification de la température par thermomètre indépendant Traçabilité de la température	28
	Matériel	Résultats erronés	Dérive du spectrophotomètre	Modification potentielle de l'activité enzymatique	5	1	2	10	Enregistrement des maintenances Résultats des CIQ/EEQ	29

Etape	Elément défaillant	Risque / événement redouté / mode de défaillance (AMDEC)	Causes (F)	Effets (G)	G	F	D	ICR	Moyens de maîtrise existants (D)	N°
Réactifs et CQI	Main d'œuvre	CQI non conforme	Mauvaise conservation des CQI	Retard dans le rendu de résultat (repassage nécessaire)	3	2	1	6	Formation/habilitation du personnel Mode opératoire MO_LAB_17_2816 Instruction de conservation des CIQ (MO_LAB_17_2816, notice fournisseur)	30
	Main d'œuvre	CQI non conforme	Mauvaise reconstitution des CQI	Retard dans le rendu de résultat (repassage nécessaire)	3	2	1	6	MO-EQU-16-1280 Métrologie des pipettes Instruction de reconstitution des CIQ (MO_LAB_17_2816, notice fournisseur)	31
	Main d'œuvre	CQI non conforme	Erreur lors de la manipulation (oubli d'un réactif, erreur de volume..)	Retard dans le rendu de résultat (repassage nécessaire)	3	2	1	6	Formation/habilitation du personnel Mode opératoire MO_LAB_17_2816 Métrologie des pipettes	32
	Matériel	Mauvaises conditions de stockage	Panne réfrigérateur, erreur humaine	réactifs non conformes, résultats erronés	4	1	2	8	Enregistrement métrologique Formation/habilitation du personnel Instructions de conservation (MO_LAB_17_2816)	33
	Méthode	Rupture de stock	Mauvaise gestion des commandes, rupture de stock fournisseur	Analyse non réalisable	4	1	1	4	Cellule de gestion des stocks	34
	Méthode	date de péremption dépassée	Mauvaise gestion des commandes, erreur humaine	Modification potentielle de l'activité enzymatique	4	1	3	12	Traçabilité des réactifs	35

Etape	Elément défaillant	Risque / événement redouté / mode de défaillance (AMDEC)	Causes (F)	Effets (G)	G	F	D	ICR	Moyens de maîtrise existants (D)	N°
Rendu de résultats	Main d'œuvre	Rendu de mauvais résultat	Erreur dans la saisie manuelle des valeurs automate sur feuille de calcul	résultat erroné pour le patient	5	1	2	10	Vérification de la concordance valeur automate / valeurs feuille de calcul lors de la validation biologique	35
	Main d'œuvre	Rendu de mauvais résultat	Erreur dans saisie des résultats sur SIL	résultat erroné pour le patient	5	1	2	10	Double vérification de la saisie informatique lors de la validation biologique	36
	Main d'œuvre	Absence de renseignements cliniques, de NFS réticulocytes associée	Défaut de formation des prescripteurs et préleveurs	Résultat potentiellement ininterprétable	4	4	1	16	Formation / Information des prescripteurs et préleveurs (Note d'information aux prescripteurs bimestrielle sur les changements de conditions préanalytiques mise en place par le pôle de biologie) Formation/habilitation du personnel, information dans MO_LAB_17_2816 Appel systématique du service en absence de NFS récente	37

Tableau de notation des risques en termes de Gravité, Fréquence et Détectabilité :

Gravité G	Fréquence F	Détectabilité D
<u>1 - MINEUR</u> : Impact minime, pas d'impact sur le résultat	<u>1-EXCEPTIONNEL</u> <1/an, 1/10 000	<u>1-INMANQUABLE</u>
<u>2 - MODERE</u> : Impact sur le travail du laboratoire, mais pas sur le résultat	<u>2 - RARE</u> : <1/trimestre, <1/1000	<u>2 - FACILE</u> moyen de détection simple et systématique
<u>3 - SIGNIFICATIF</u> : Impact sur le travail du laboratoire, le résultat mais pas la prise en charge	<u>3 - PEU FREQUENT</u> <1/mois, <1/500	<u>3 - ALEATOIRE</u> moyen de détection simple mais sporadique
<u>4 - IMPORTANT</u> : Impact sur le travail du laboratoire, le résultat et sans conséquence grave	<u>4 - FREQUENT</u> <1/semaine, <1/100	<u>4 - DIFFICILE</u> moyen de détection difficile et sporadique
<u>5 - MAJEUR</u> : Impact majeur sur la prise en charge du patient	<u>5 - TRES FREQUENT</u> <1/jour, <1/10	<u>5 - INDETECTABLE</u>

Avec : Indice de criticité ICR = G*F*D

Seuil d'alerte = 10

Seuil de priorisation = 16

Annexe III : Fiche de tutorat Technicien pour le dosage enzymatique de la G6PD par méthode Biosentec

	Entité d'application : PBP- --- - PABIM-LU	EN_GRH_16_665
	Emetteur : PBP - P4 - HEM	Ind : 06
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT		Page : 1/5
FICHE TUTORAT TECHNICIEN DOSAGE G6PD		

EMPLOI-TYPE :

Cocher la case concernée :

- Technicien de laboratoire
- OPQ/MO/AL
- Ingénieur
- Autres :

Objectif :

Lister les compétences à acquérir par les techniciens en vue de leur habilitation au poste de travail. Les critères obligatoires pour une habilitation se distinguent des *critères facultatifs présentés en italique et grisés.*

Chaque critère est vérifié de manière objective, décrite dans la fiche de tutorat.

Site hospitalier : Groupe Hospitalier Sud-Saint André-Pellegrin

Discipline : Hématologie Spécialisée

Secteur d'activités : PABIM

<p>NOM, Prénom del'agent tuteuré :</p> <p>Code agent :</p> <p>Nom du (ou des) agent(s) tuteur(s) :</p> <p>Période de compagnonnage :</p>	
<p>Conclusion fin de période de compagnonnage/tutorat :</p> <p>- Checklist complète <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON</p> <p>- Aptitude pressentie à l'habilitation <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON</p>	

Temps de formation Tuteur + Tutoré moyen: 10 jours

	Entité d'application : PBP- --- - PABIM-LU	EN_GRH_16_665
	Emetteur : PBP - P4 - HEM	Ind : 06
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT		Page : 2/5
FICHE TUTORAT TECHNICIEN DOSAGE G6PD		

	VU/LU	ACQUIS	Nécessite une formation complémentaire	Initiales tuteur
1-Théorie				
- Participation au module de formation d'hématologie cellulaire 4.5				
2- Documents Qualité				
- Lecture des documents spécifiques du poste* : MO-LAB-17-2816 IN-LAB-18-1493 EN-LAB-18-1494 Comprenant la connaissance : - des conditions préanalytiques de l'analyse - des conditions de réalisation de l'analyse - des éléments nécessaires à l'interprétation du dosage - des plages horaires de réalisation de l'analyse et de la conduite à tenir en cas de réception en dehors de celles-ci				
- Connaissance de l'emplacement des documents support (copies maîtrisées)				
- Savoir retrouver une information dans SharePoint				
3- Informatique				
Utiliser les logiciels et outils informatiques du laboratoire				
- Connexion, déconnexion outils informatiques (portail, automates, LPM...)				
- Feuille de travail G6PD: connaître son emplacement et avoir procédé à la saisie de résultats d'au moins 2 séries de dosages sur celle-ci				
- GLIMS : lecture des documents qualité sur Sharepoint*				
- Connaître la procédure dégradée en cas de pannes SIL, lecture du document : MO_INF_18_561 * LPM-utilisation en cas de panne GLIMS				
- Créer et modifier une demande d'examen (ajout, suppression, saisie de résultat et commentaire...)				

Simulation effectuée le :/...../.....	Sur dossiers N° :
Supervisée par :	CONCLUSION :

	Entité d'application : PBP- --- - PABIM-LU	EN_GRH_16_665
	Emetteur : PBP - P4 - HEM	Ind : 06
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT		Page : 3/5
FICHE TUTORAT TECHNICIEN DOSAGE G6PD		

• Vérification de l'attestation de lecture sur Share Point ou papier par cadres

Les actions surlignées en jaune devront être réalisées 1 fois avec l'aide du tuteur et 2 fois en autonomie sous contrôle du tuteur.

1. Réception et préanalytique

- Connaissance de l'accès au catalogue de biologie
- Conditions d'acheminement des échantillons
- Connaissance des critères d'acceptation des prélèvements
- CAT en cas de non-conformité
- Connaissance des modalités de centrifugation (vitesse, durée, température)
- Préparation d'une série de culots globulaires
- Savoir remplir la biothèque de congélation sur le SIL et vérifier qu'un dosage de réticulocytes a bien été effectué

VU/LU	ACQUIS	Nécessite une formation complémentaire	Initiales tuteur

Simulation effectuée le :/...../.....

Sur dossiers N° :

Supervisée par :

CONCLUSION :

2. Matériel

- Utilisation du spectrophotomètre (Allumage, paramétrage)
- Utilisation du bain marie (Allumage, réglage de la température)
- Impression des résultats du spectrophotomètre
- Connaître la procédure dégradée en cas de panne du spectrophotomètre ou du bain marie

VU/LU	ACQUIS	Nécessite une formation complémentaire	Initiales tuteur

Simulation effectuée le :/...../.....

Sur dossiers N° :

Supervisée par :

CONCLUSION :

	Entité d'application : PBP- --- - PABIM-LU	EN_GRH_16_665
	Emetteur : PBP - P4 - HEM	Ind : 06
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT		Page : 4/5
FICHE TUTORAT TECHNICIEN DOSAGE G6PD		

3. Analytique

- Préparation d'une série d'hémolysat
- Réalisation d'une série de dosage d'activité enzymatique
- Réalisation d'un dosage de l'hémoglobine de l'hémolysât sur automate DXH

VU/LU	ACQUIS	Nécessite une formation complémentaire	Initiales tuteur

Simulation effectuée le :/...../.....

Sur dossiers N° :

Supervisée par :

CONCLUSION :

4. CQI

- Reconstitution de CQI haut et bas Biosentec
- Passage des CQI dans une série de dosage et interprétation
- CAT en cas de CQI non conforme

VU/LU	ACQUIS	Nécessite une formation complémentaire	Initiales tuteur

Simulation effectuée le :/...../.....

Sur dossiers N° :

Supervisée par :

CONCLUSION :

	Entité d'application : PBP- --- - PABIM-LU	EN_GRH_16_665
	Emetteur : PBP - P4 - HEM	Ind : 06
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT		Page : 5/5
FICHE TUTORAT TECHNICIEN DOSAGE G6PD		

5. CQE

- Connaissance des modalités de réception et de préanalytique des CQE
- Passage d'un échantillon CQE

VU/LU	ACQUIS	Nécessite une formation complémentaire	Initiales tuteur

Simulation effectuée le :/...../.....

Sur dossiers N° :

Supervisée par :

CONCLUSION :

**Annexe IV: Fiche d'habilitation Technicien pour le dosage enzymatique de la G6PD par
méthode Biosentec**

	Entité d'application : PBP - --- - PABIM-LU Emetteur : PBP - P4 - HEM	EN_GRH_16_6 47 Ind : 02
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	Page : 1/3
FICHE HABILITATION TECHNICIEN DOSAGE G6PD		

Site Hospitalier

Discipline

Nom de l'automate ou poste de travail

Nom, Prénom du technicien évalué

Code agent

Période de tutorat

(nombre de journées en binôme, nombre de journées d'encadrement)

Habilitation :

- 1) Habilitation initiale nouvel arrivant (PABIM + LU)
 - a. 3j de tutorat (A)
 - b. 1 matinée (4h) de formation théorique (B)
 - c. 6j d'autonomie avec tuteur à disposition
 - d. Quizz d'évaluation (C)

- 2) Habilitation initiale techniciens en poste avant 2018 : Validation par expérience
 - a. Remplir la fiche de tutorat en auto-évaluation (A)
 - b. Quizz d'évaluation (C)
 - c. Mise en situation : 2h de vérification technique avec le biologiste (B)

- 3) Maintien des compétences
 - a. Ne pas avoir d'absence >3mois
 - b. Quizz d'évaluation (C)
 - c. Mise en situation : 2h de vérification technique avec le biologiste (B)

- 4) Réhabilitation (en cas d'absence entre 3 et 6 mois)
 - a. 1j de tutorat (A)
 - b. 1j d'autonomie avec tuteur à disposition (B)
 - c. Quizz d'évaluation (C)

	Entité d'application : PBP- --- - PABIM-LU	EN_GRH_16_6
	Emetteur : PBP - P4 - HEM	47
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT		Ind : 02
Page : 2/3		
FICHE HABILITATION TECHNICIEN DOSAGE G6PD		

Critères objectifs d'Habilitation		NA	A	Commentaires éventuels
		A	Evaluation pratiques : (Cf Fiche de tutorat)	
1	Documents qualité			
2	Informatique			
3	Réception et pré analytique			
4	Matériel			
5	Analytique			
6	CQI			
7	CQE			
B	Formation théorique			
	Attestation de formation au module d'hématologie cellulaire 4.5. Date :			
ou	Mise en situation avec le biologiste. Date :			
ou	Formation dispensée par le biologiste responsable. Date :			
C	Questionnaire d'habilitation (>80% réponses exactes)			
	Note obtenue :			

LEGENDE : N : Non Acquis A : Acquis

	Entité d'application : PBP- ---- PABIM-LU Emetteur : PBP - P4 - HEM	EN_GRH_16_6 47 Ind : 02
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	Page : 3/3
FICHE HABILITATION TECHNICIEN DOSAGE G6PD		

HABILITATION :	OUI	NON	
<u>SIGNATURE :</u>			
BIOLOGISTE DU SECTEUR :		CADRE DE SANTE :	
CHEF DE SERVICE D'HEMATOLOGIE:		TECHNICIEN EVALUE :	
<p>Pour les prochaines (ré)habilitations, veuillez créer autant de fois que nécessaire le pavé suivant à remplir au regard d'une nouvelle fiche d'évaluation si nécessaire (dernière habilitation > 3 ans, absence > 4 mois, modification du poste) :</p>			
(RE)HABILITATION :	OUI	NON	Niveau :
<p>Veillez mentionner les items modifiés ou ajoutés par rapport à l'habilitation précédente, si évolution des tâches / du niveau acquis sur le poste :....</p>			
<u>SIGNATURE :</u>			
BIOLOGISTE DU SECTEUR:		CADRE DE SANTE :	
CHEF DE SERVICE D'HEMATOLOGIE:		TECHNICIEN EVALUE :	

SERMENT DE GALIEN

« Je jure, en présence des maîtres de la faculté, et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque. »

Establishment of a new method for assaying enzymatic activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in red blood cells

Abstract

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is the most common human enzyme defect worldwide, with more than 400 million affected people. G6PD-deficient patients are at risk to develop acute haemolytic anemia after ingestion of certain foods such as beans or oxidant drugs. Diagnosis is based on the quantitative estimation of G6PD activity in red blood cells by spectrophotometric analysis. As part of the accreditation process of laboratories according to standard NF EN ISO 15189, a validation process of a new manual and quantitative assay was made in order to ensure the reliability and accuracy of the results.

Date et lieu de soutenance : 19 octobre 2018 à Bordeaux

Mise en place d'une nouvelle méthode de dosage de l'activité enzymatique érythrocytaire de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD)

RESUME

Le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est le déficit enzymatique le plus fréquent au monde, touchant plus de 400 millions de personnes et exposant à la survenue d'accident hémolytique aigu après ingestion de certains aliments comme les fèves ou médicaments oxydants par les personnes déficitaires. Son diagnostic est basé sur le dosage de l'activité enzymatique érythrocytaire de la G6PD par méthode spectrophotométrique.

Dans le cadre de la démarche d'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO 15189, une vérification de méthode de cette analyse manuelle et quantitative a été réalisée, afin de garantir la fiabilité et l'exactitude des résultats rendus.

DISCIPLINE administrative : pharmacie – biologie médicale

MOTS-CLES : Déficit en G6PD ; anémie hémolytique ; ictère ; favisme ; dosage enzymatique ; vérification de méthode ; quantitatif ; portée A

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Service d'hématologie biologique
Hôpital Pellegrin CHU Bordeaux
Place Amélie Raba Léon
33076 Bordeaux Cedex

Directeur de thèse : Mme le Docteur Stéphanie Dulucq