

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد الصديق بن يحي جيجل
Université de Mohamed Seddik Ben Yahia - Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie
Département de Biologie Moléculaire et
Cellulaire



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire de Master

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Biologie
Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

Recherche du variant africain A- du déficit en glucose-6-phosphate
déshydrogénase par PCR-RFLP

Membres de Jury :

Présidente : Mme BENSAM Moufida
Examinatrice : Dr ABBES Arbia
Encadrant : Mme BENSEGHIER Salima

Présenté par :

BOUBRIOUA Amina
BOUREFROUF Ouahiba
SEGHIER Wafa

Année Universitaire 2020-2021

Numéro d'ordre (bibliographique) :

Remerciements

*Nous tenons tout d'abord à remercier **DIEU** tout puissant*

Merci de nous avoir tenues en bonne santé pour la réalisation de ce mémoire,

Merci de nous avoir guidées vers le chemin de la lumière et du savoir,

Merci de nous avoir donnée la force et le courage d'entreprendre ce travail.

*Nos vifs remerciements vont également à **nos familles** pour leur apport permanent*

tout au long de ce parcours.

*En second lieu, notre reconnaissance et nos remerciements vont à notre encadreur Madame **BENSEGHIER Salima**, pour son aide, sa gentillesse et ses encouragements qui ont constitués un apport considérable sans elle ce travail*

n'aurait pas pu être mené au bon port.

Nos vifs remerciements vont également aux

*membres du jury : docteur **ABBES Arbia** et madame **BENSAM Moufida**, pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

Nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Enfin, Nos remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce mémoire de Master.

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu durant tout mon
parcours universitaire*

À mes très chers parents :

*Mon père **YOUCEF** et ma mère **NADIA**, Nul mot ne saurait exprimer à sa juste
valeur le dévouement et le profond respect que je porte envers vous. Rien au
monde ne pourrait compenser tout ce que vous avez fait pour moi, Que ce travail
soit le témoignage de ma gratitude et de mon grand amour.*

Que DIEU vous accorde, santé, bonheur, longue vie et prospérité.

*À ma soeur **ASMAA***

*en témoignage de l'attachement, de l'amour et
de l'affection, Merci pour l'aide et le soutien que vous m'avez accordé.*

*À mes proche amies et ma cousine **FERIEL***

Pour ces encouragements et motivations,

*Aux petits anges de ma famille **RANIA, MOHAMED et ISLEM**. Que DIEU vous garde*

*À mon trinôme **OUAHIBA, Wafa***

À mes camarades du master 2 biologie moléculaire et cellulaire promotion

2020-2021

*À tous les membres de ma **Famille** et à tous ceux qui m'aiment et tous ceux que j'aime.*

Merci d'être toujours là pour moi.

BOUBRIOUA Amina

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu durant tout mon
parcours universitaire*

A mes très chers parents :

*Mon père **Nour Eddine** et ma mère **Rachida**, Nul mot ne saurait exprimer à sa juste
valeur le dévouement et le profond respect que je porte envers vous. Rien au
monde ne pourrait compenser tout ce que vous avez fait pour moi, Que ce travail
soit le témoignage de ma gratitude et de mon grand amour.*

*Que **DIEU** accorde, santé, bonheur, longue vie et prospérité.*

À mes frères et soeurs

***Saleh et Mohammed**, mon petite frère **Amîr**, **Sara et Noussaiba**, **Bassma**, **Rania**, en
témoignage de l'attachement, de l'amour et
de l'affection, Merci pour l'aide et le soutien que vous m'avez accordé.*

*A mes proche amies, **Sawsan**, **Yasmine**, **Habiba**,*

*A mon trinôme **Amina**, **Ouahiba***

A mes camarades du master 2 biologie moléculaire et cellulaire promotion

2020-2021

À tous les membres de ma famille et à tous ceux qui m'aiment et tous ceux que j'aime.

Merci d'être toujours là pour moi.

Seghier wafa

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu durant tout mon
parcours universitaire*

A mes très chers parents :

*Mon père **SLIMANE** et ma mère **YAMINA**, Nul mot ne saurait exprimer à sa juste
valeur le dévouement et le profond respect que je porte envers vous. Rien au
monde ne pourrait compenser tout ce que vous avez fait pour moi, Que ce travail
soit le témoignage de ma gratitude et de mon grand amour.*

Que DIEU vous accorde, santé, bonheur, longue vie et prospérité.

À mes frères et soeurs

***HOUSSEM** et **MOHAMMED**, mon petit frère **ABD ELRAHMANNE** , mes sœurs **FARAH**
et **CHAIMA**, en témoignage de l'attachement, de l'amour et
de l'affection, Merci pour l'aide et le soutien que vous m'avez accordé.*

*À mon fiancé **YAKOUB**: Pour vos encouragements et motivations*

*À mes proche amies et mon trinôme **AMINA, Wafa***

À mes camarades du master 2 biologie moléculaire et cellulaire promotion

2020-2021

*À tous les membres de ma **Famille** et à tous ceux qui m'aiment et tous ceux que j'aime.*

Merci d'être toujours là pour moi.

BOUREFROUF Ouahiba

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur le déficit en G6PD

I.1. Historique..... 2

I.2. Épidémiologie..... 3

I.3. Facteurs déclenchants..... 4

I.3.1. Aliments..... 4

I.3.2. Infections..... 5

I.3.3. Médicaments..... 5

I.4. Association avec d'autres maladies..... 5

I.4.1. Déficit en G6PD-drépanocytose..... 5

I.4.2. Déficit en G6PD-Paludisme..... 5

I.4.3. Déficit en G6PD-Covid-19..... 6

I.5. Manifestations Cliniques..... 6

I.5.1. Ictère néonatal..... 6

I.5.2. Anémie hémolytique aiguë..... 6

I.5.3. Anémie hémolytique chronique..... 7

Chapitre II : Physiopathologie

II.1. Structure de G6PD..... 8

II.2. Rôle de G6PD..... 9

II.3. Mécanisme de déficit en G6PD..... 9

Chapitre III : Aspects génétique

III.1. Gène G6PD.....	11
III.2. Mutations de gène G6PD.....	12
III.3. Mécanisme de transmission.....	12
III.4. Variantes de G6PD.....	12

Chapitre IV : Diagnostic et traitement

IV.1. Diagnostic.....	15
IV.1.1. fluorescent spot test.....	15
IV.1.2. Dosage spectrophotométrique de l'activité enzymatique G6PD.....	15
IV.1.3. Test de stabilité de glutathion réduit.....	15
IV.1.4. Test de biologie moléculaire par l'étude de l'ADN.....	15
IV.2. Traitement.....	16
IV.2.1. Traitement préventif.....	16
IV.2.2. Traitement symptomatique.....	16
IV.2.3. Traitement adjuvant.....	17

Partie pratique

I. Patients et méthodes

I.1. Cadre d'étude.....	18
I.2. Population étudiée.....	18
I.3. Critère d'inclusion.....	18
I.4. Paramètre étudié.....	18
I.5. Méthodes.....	18
I.5.1 Hémogramme	18
I.5.2. Test de Coombs.....	19
I.5.3. Dosage de l'activité enzymatique de la G6PD.....	19
I.5.4. Extraction d'ADN.....	19
I.5.5. Protocole PCR-RFLP.....	20

II. Résultats et discussions	22
Conclusion	31
Références bibliographiques	33
Annexes	

Liste des abréviations

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire et des Produits de Santé

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

COVID-19 : Coronavirus 2019

G6PD : Glucose- 6- Phosphate Déshydrogénase

GS-SG: Glutathion_S_S_ Glutathion

G-SH : Glutathion_Sulphydryle

HAS : Haute Autorité de Santé

HCoV : Human Coronavirus

NADP+ : Nicotinamide Adénine Di nucléotide Phosphate

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PNDP : Protocole National de Diagnostic et de Soins

SARS-CoV : Coronavirus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

VGM : Volume Globulaire Moyen

WGW: Who Working Group

Liste des figures

Figure 1 : Prévalence du déficit en G6PD en pourcentage par pays.....	4
Figure 2 : Structure moléculaire du dimère de la G6PD.....	8
Figure 3 : G6PD protège la cellule contre le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) généré par le stress oxydatif	10
Figure 4 : Localisation du gène de la G6PD sur le chromosome X	11
Figure 5 : Gène de la Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase	11

Liste des tableaux

Tableau 1 : Localisation et fonction des 12 régions conservées dans la molécule de G6PD.....	9
Tableau 2 : Classification des variantes de la G6PD selon leur activité.....	13
Tableau 3 : Présentation des premiers paramètres de l'hémogramme.....	22
Tableau 4 : Cas présentant une activité accrue de la G6PD.....	22

Introduction

Le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est le plus fréquent des déficits héréditaires enzymatiques du globule rouge chez l'homme il touche environ 420 millions de personnes dans le monde (**Kaddari et al, 2004**). Il s'agit d'une maladie génétique liée au sexe, touchant plus particulièrement les populations africaines, méditerranéennes et d'Extrême-Orient (**OMS, 1990**).

La maladie est transmise génétiquement sur le mode récessif, le gène étant situé sur le chromosome X. Elle touche en grande majorité les hommes, dit hémizyotes, tandis que les femmes sont le plus souvent seulement transmettrices de l'anomalie (hétérozygotes), à l'exception de cas de femmes chez lesquelles le déficit s'exprime (homozygotes). Chez les femmes hétérozygotes, la situation est complexe en raison de l'inactivation au hasard du gène d'un des chromosomes X qui génère deux populations en proportions variables d'hématies déficitaires ou non (**Mégarbane, 2008**).

La G6PD est l'enzyme limitant la vitesse dans la voie des pentoses phosphates. La G6PD convertit le glucose-6-phosphate (G6P) en 6-phosphogluconolactone avec la production concomitante de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), un équivalent réducteur nécessaire à la biosynthèse réductrice et l'homéostasie redox (**Salati et Amir-Ahmady, 2001 ; Ho et al., 2007**). la prise de certains médicaments (dapsoné, cotrimoxazole, primaquine,...), la consommation de certains aliments (fèves), et une variété d'infections (rickettsioses, infections à *Escherichia coli*,...) entraînent chez les personnes déficitaires une anémie hémolytique d'intensité et de gravité variables (**Mura et al., 2009**).

Plusieurs variants (environ 160 mutations différentes) ont été identifiés, avec une répartition géographique caractéristique. Les trois principaux sont le variant « A– dit africain » retrouvé chez les sujets noirs, le variant « méditerranéen » associé à des manifestations cliniques généralement sévères et le variant « canton » des asiatiques. La majorité des mutations découvertes entraîne un déficit en G6PD du globule rouge (GR) en réduisant la stabilité de l'enzyme. L'OMS a classifié les déficits en G6PD en 5 classes selon le niveau d'activité G6PD résiduelle (**Mégarbane, 2008 ; Luzzatto et Arese, 2018**).

L'objectif principal de cette étude était de rechercher les mutations africaines (c. 202 G>A ; c. 376 A>G ; p.68 Val>Met ; p.126 Asn>Asp) par PCR-RFLP des patients déficitaires en G6PD, ainsi de déterminer et de confirmer le déficit par le dosage de l'activité enzymatique chez les enfants hospitalisés au service de pédiatrie en raison d'une crise hémolytique.

Partie

bibliographique

Chapitre I :

Généralités sur le

déficit en G6PD

Le déficit en G6PD, appelé aussi « favisme » est une maladie génétique, héréditaire qui atteint les GR du sang (**VIGIFAVISME, 2008**). Le G6PD est une protéine (enzyme) qui aide au bon fonctionnement des cellules de l'organisme. Il protège les GR en permettant l'élimination des substances oxydantes qui sont néfastes pour eux. Le G6PD agit donc comme antioxydants (**Megarbane, 2008**).

I.1. Historique

Le déficit en G6PD n'est pas récent, il est connu dans certaines populations depuis longtemps. Cependant, ce n'est qu'au XIXe siècle que des revues médicales ont commencé à apparaître, des observations mettant en relation l'ingestion de fèves et la survenue d'un accident hémolytique, notamment au Portugal où sont publiées les premières observations d'ictères successifs chez un malade après chaque ingestion de fèves (**Meletis et Konstantopoulos, 2004**).

Les premières observations en Grèce, d'anémies hémolytiques faisaient suite à des ingestions de fèves, et c'est ainsi que Pythagore recommande de ne pas consommer de fèves. Cette règle s'appliquait aux fèves grecques, qui étaient cultivées et largement utilisées en Méditerranée (**Meletis et Konstantopoulos, 2004**).

Ce n'est qu'à la fin du XIXe siècle que furent de plus en plus rapportés des cas de poussées ictériques après ingestion de fèves, créant ainsi le terme de favisme pour décrire ce phénomène. Le terme de favisme naissait alors, décrivant cette étrange relation entre l'ingestion de fèves et la survenue de crises ictériques, dans les régions où les fèves étaient largement cultivées (**Wajcman et Galacteros, 2004**).

Après des recherches épidémiologiques, ce n'est qu'en 1905 qu'il a été identifié avec plus de précision. Les manifestations cliniques de la maladie, les caractéristiques familiales et l'état du patient sont rapportés des sujets jeunes, en particulier du sexe masculin les premières explications possibles sur le mécanisme du favisme ont été émises, suite à la découverte d'une possible implication du déficit en G6PD dans la défense contre le paludisme, affection qui sévit dans le sud de l'Italie et en Grèce (**Meletis et Konstantopoulos, 2004**). Puis, il a été rapporté par Cordes en 1926, une relation entre la survenue d'anémie aiguë et la prise de certains médicaments (**Brancarel et al., 2010**).

En 1956, l'équipe du Dr Carson a identifié que le déficit en enzyme G6PD était la cause de la maladie (**Baker, 2013**).

En 1958, Childs a découvert l'anomalie génétique responsable de cette enzymopathie sur le chromosome X, expliquant de ce fait pourquoi la pathologie touchait préférentiellement les hommes (**Beutler, 1959**).

Puis en 1959, Beutler décrit le mécanisme biochimique de l'anémie hémolytique après la prise de médicaments oxydants (**Beutler, 1959**).

En 1967, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), publié les premières listes de médicaments dangereux (**WGW, 1989**).

En 1986, le séquençage et le clonage du gène de G6PD (**Cappellini et Fiorelli, 2008**).

En 1996, la structure tridimensionnelle de l'enzyme du modèle humain a été développé (**Naylor et al., 1996**).

I.2. Épidémiologie

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 (**Nkhoma et al., 2009**). 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 plus répandus dans certaines parties d'Europe du nord (**Cappellini et Fiorelli, 2008**).

Parmi les nombreux variants moléculaires connus du déficit en G6PD, le plus répandu est la G6PD A- avec une prévalence de 11% à 13% chez les afro-américains (**Ho et Joh, 2015**). Il concerne 90 % des patients déficitaires en Afrique tropicale. Le deuxième variant le plus répandu est la G6PD Méditerranéen (G6PD Med), sa répartition est de l'ordre de 2 à 20% dans différentes populations, sauf pour les Juifs kurdes sa prévalence est estimée à 70%. Il est présent dans tous les pays du pourtour de la Méditerranée (**Howes et al., 2013**). Il est également répandu au Moyen-Orient. Dans de nombreuses populations, on note la coexistence des variant G6PD A- et G6PD Med : c'est le cas des pays du Golfe Persique (**Howes et al., 2013**).

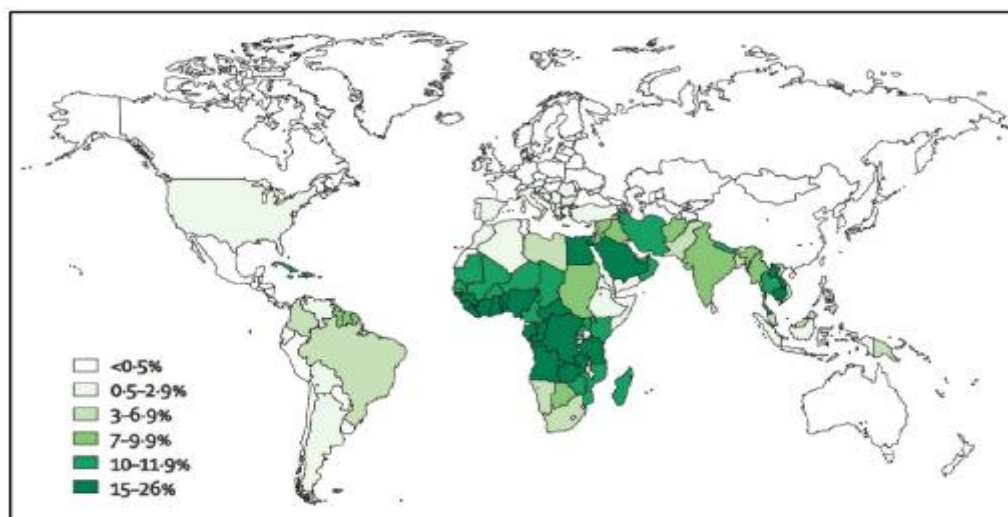


Figure 1 : Prévalence du déficit en G6PD en pourcentage par pays (Hofmann *et al.*, 2016).

I. 3. Facteurs déclenchants

L'hémolyse peut être déclenchée par la prise de certains aliments ou de certains médicaments, ou par une infection virale ou bactérienne. Leur influence est variable selon l'individu et le type de déficit (Megarbane, 2008).

I.3.1. Aliments

Les facteurs déclenchant d'une hémolyse peuvent être l'ingestion de certains aliments (fèves, légume). L'hémolyse et l'anémie surviennent de quelques heures à un ou deux jours après l'ingestion de fève. Ces derniers contiennent deux glycosides, la vicine et la convicine, dont l'hydrolyse par des glucosidases conduit à la divicine et à l'isouramil. Ces composés ont une activité antifongique et pesticide, ce qui aide probablement à prévenir les fèves de pourrir, mais ces composés présentent également des propriétés oxydantes voisines de celles de la quinine et sont capables de déclencher une attaque de favisme (Desrosches *et al.*, 1995, Pavlik *et al.*, 2002, Megarbane, 2008).

Même l'inhalation des pollens de fleurs de fèves peuvent entraîner une anémie hémolytique (AFSSAPS, 2008). Il est interdit aux personnes ayant un déficit en G6PD de consommer les variétés les plus courantes de fèves. Les compléments alimentaires contenant des extraits de fève doivent également être évités. De même, la consommation de fève par une hémorragie peut induire une maladie chez les nouveau-nés ou son nourrisson allaité (Megarbane, 2008).

I.3.2. Infections

La survenue d'infections virales ou bactériennes (hépatite virale, infection à *Escherichia coli* ou à *streptocoque*) chez les déficitaires en G6PD peuvent provoquer une hémolyse aiguë à l'origine d'une anémie hémolytique, qui peut nécessiter une transfusion sanguine dans les cas les plus graves (ANSM, 2014).

I.3.3. Médicaments

Certains médicaments peuvent être responsables d'une hémolyse chez les sujets déficitaires en G6PD. Certains ont été associés à des cas d'hémolyse aiguë lorsqu'ils étaient utilisés à des doses supérieures aux doses recommandées. Aussi, il est d'autant plus important avec ces médicaments de respecter strictement la posologie et ne jamais dépasser les doses maximales recommandées (ANSM, 2014).

I.4. Association avec d'autres maladies

I.4.1. Déficit en G6PD-drépanocytose

La drépanocytose et le déficit en G6PD sont deux anomalies génétiques du GR, responsables d'anémie hémolytique (Diop *et al.*, 2000). Leur association chez le même patient mérite d'être reconnue afin de mieux adapter la prise en charge. La prévalence du déficit en G6PD est plus grande chez les drépanocytaires par rapport à des sujets indemnes d'hémoglobinoses. Les interactions entre ces deux anomalies surviendraient ainsi sous l'influence de certains facteurs environnementaux. Il s'avère retrouvé que la prévalence du déficit en G6PD était identique chez les drépanocytaires et les sujets normaux à la naissance, et que la plus grande fréquence de déficients se retrouvait surtout après la naissance (Diop *et al.*, 2000).

I.4.2. Déficit en G6PD-Paludisme

Il existe un lien étroit entre la déficience en G6PD et la résistance au paludisme (Bancarel *et al.*, 2010). Les GR déficitaires sont particulièrement sensibles aux stress oxydants. Ce déficit protège contre les formes graves de paludisme en offrant un milieu défavorable au développement d'un parasite, lui-même très sensible aux oxydants. La contrepartie de cet avantage est un risque hémolytique accru en réponse à de multiples agents oxydo-réducteurs (Wajcman et Galacteros, 2004).

I.4.3. Déficit en G6PD-COVID-19

Un problème de santé qui pourrait augmenter le risque de mortalité chez les personnes infectées par le COVID-19 est le déficit enzymatique G6PD. Les cellules déficientes en G6PD étaient infectées par le coronavirus humain (HCoV) à un taux plus élevé que les cellules normales. De plus, le statut G6PD contribue au statut et à la survie d'autres maladies virales (**Aydemir et Ulusu, 2020**).

L'hydroxychloroquine déclenche une crise hémolytique chez les patients déficients en G6PD, et l'administration hors AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) de ce médicament à des patients infectés par le nouveau coronavirus (SARS-CoV-2) pourrait être préoccupante. Avec la propagation mondiale de ce virus, en particulier dans les régions à forte prévalence de déficit en G6PD devrait être pris en compte dans l'évaluation de risque de la pandémie (**Aydemir et Uluru, 2020, Beauverd, 2020**).

I.5. Manifestations Cliniques

I.5.1. Ictère néonatal

La principale cause de l'ictère néonatal chez les enfants déficients en G6PD est l'incapacité du foie à conjuguer adéquatement la bilirubine (**Kaplan et al., 1997**). Dans cette période, la principale manifestation du déficit en G6PD est l'hyperbilirubinémie. L'ictère n'est généralement pas présenté à la naissance, l'apparition clinique se situant entre le deuxième et le troisième jour (**Kaplan et al., 2016**). Le mécanisme par lequel le déficit provoque l'hyperbilirubinémie néonatale n'est pas entièrement compris, bien qu'une hémolyse puisse être observée chez les nouveau-nés atteints d'un déficit et présentant un ictère (**Nouri et Danesh, 2008**).

I.5.2. Anémie hémolytique aigue

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 oxydatif, la présence excessive de radicaux libres accélère la conversion et l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine. Les globules rouges les plus endommagés seront rapidement détruits dans la circulation sanguine, tandis que les autres globules rouges affaiblis seront avalés par les macrophages de la rate. Par conséquent, le mécanisme impliqué se trouve l'hémolyse intravasculaire à l'hémolyse extravasculaire (**Luzzatto et arese, 2018**).

La crise hémolytique commence 2 à 3 jours après l'exposition aux événements oxydatifs et se poursuit par l'augmentation du taux de bilirubine. L'anémie peut persister 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 (**PNDS, 2017**).

I.5.3. Anémie hémolytique chronique

L'anémie hémolytique chronique s'accompagne des complications habituelles des hémolyses chroniques associant l'ictère et la splénomégalie. L'hémolyse apparaît en l'absence de facteur déclenchant connu, malgré l'exposition à certains médicaments à potentiel oxydatif peut augmenter l'hémolyse préexistante. Le degré d'anémie est extrêmement variable allant de l'anémie néonatale sévère à l'hémolyse totalement compensée diagnostiquée à l'âge adulte. Le plus souvent la révélation est précoce car la sévérité de cette pathologie est maximale dans la petite enfance et le diagnostic le plus souvent posé au cours des 2 premières années de vie (**Pissard, 2014**).

Après la première enfance, les symptômes d'hémolyse sont minimes et inconstants, la pâleur est rare, l'ictère conjonctival n'apparaît que de façon intermittente et la rate à un volume rarement augmentée (**Mason et al., 2007**).

Chapitre II :

Physiopathologie

II.1. Structure de G6PD

Chez l'homme, Le G6PD est une enzyme ubiquitaire retrouvée dans toutes les cellules de l'organisme (Nataro *et al.*, 2000 ; Wajckman et Galacteros, 2004). Elle est active sous forme de dimère ou de tétramère dans un équilibre dépendant du pH. Chaque monomère de cette enzyme est constitué de 514 acides aminés avec un poids moléculaire de 59 kDa (Shannon *et al.*, 2000). L'enzyme comprend deux domaines qui sont lié par une hélice α qui contient la totalité des 8 résidus peptidiques agissent comme un site de liaison du substrat. Un domaine N-terminal β - α - β où va se lier le coenzyme NADP⁺, et un second domaine β + α , plus large, constitué d'un feuillet antiparallèle à neuf brins (Cappellini et Fiorelli, 2008). Chaque monomère a la particularité de posséder une molécule de NADP⁺ structurale (Figure 2). La région N-terminale est stabilisée par un pont disulfure (Shannon *et al.*, 2000).

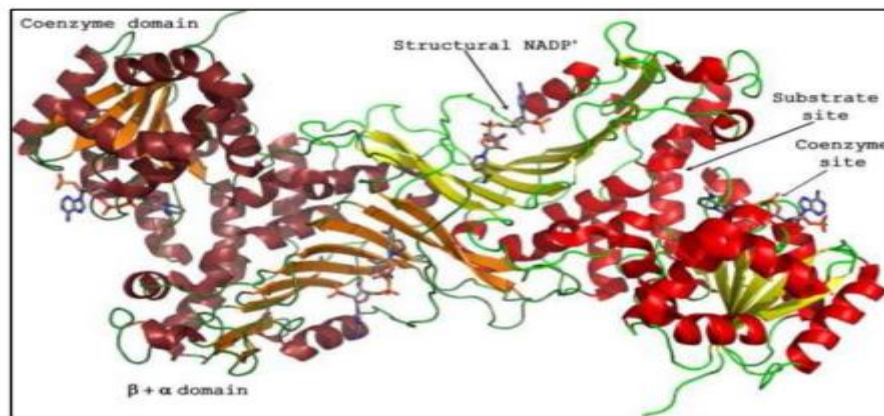


Figure 2 : Structure moléculaire du dimère de la G6PD (Shannon *et al.*, 2000).

Une sous-unité est représentée en rouge et vert alors que la deuxième sous-unité est représentée en différents tons de marron.

La transformation des monomères inactifs en enzyme dimérique active ne peut survenir en l'absence de NADP⁺ (Kirkman et Hendrickson, 1962). L'enzyme contient douze régions conservées qui ont sans doute un rôle dans la fonction et la structure de la molécule. Les localisations de ces régions et leur fonction probable sont indiquées dans le tableau 1 (VIGIFAVISME, 2009).

Tableau 1 : Localisation et fonction des 12 régions conservées dans la molécule de G6PD (Salvador et Savageau, 2003)

Région I	Résidus 34-53	Exons 2 et 3	Site de liaison du coenzyme
Région II	137-148	Exon 5	Core hydrophobe de la protéine
Région III	166-180	Exon 6	Zone conservée faisant face au centre actif
Région IV	193-218	Exon 6	Site catalytique
Région V	240-274	Exon 7-8	Zone conservée faisant face au centre actif
Région VI	284-292	Exon 9	Hélices alpha amphipatiques
Région VII	333-339	Exon 9	Core hydrophobe de la protéine
Région VIII	347-362	Exon 9-10	Core hydrophobe de la protéine
Région IX	365-376	Exon 10	Core hydrophobe de la protéine
Région X	388-404	Exon 10	Contact entre sous-unité
Région XI	433-443	Exon 11	Core hydrophobe de la protéine
Région XII	451-464	Exon 12	Hélice alpha amphipatiques

II.2. Rôle de G6PD

La G6PD joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire, ce qui est crucial pour la survie cellulaire (Meiling *et al.*, 2000). L'enzyme limitant la vitesse dans la voie des pentoses phosphate est nécessaire pour la synthèse des pentoses (Siqueira *et al.*, 2014). Il est également impliqué dans la réduction du NADP en NADPH, coenzyme essentiel à la lutte contre les agressions oxydantes (Wajckman et Galacteros, 2004).

Le NADPH généré a été montré pour être essentiel pour la protection des cellules contre les dommages oxydatifs. Les cellules luttent contre les agents oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène, hautement toxique pour la cellule, grâce au glutathion réduit (Meiling *et al.*, 2000).

II.3. Mécanisme de G6PD

La G6PD catalyse la première étape de la voie des pentoses, permettant la réduction du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺) en nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) par récupération d'atomes d'hydrogène du G6P qui devient 6-phosphogluconolactone. Cette oxydoréduction cyclique est entretenue grâce au retour à l'état NADP⁺ du NADPH par l'abandon de son hydrogène au profit du glutathion

oxydé (GS-SG) qui devient glutathion réduit (G-SH). Ce mécanisme est une phase essentielle de lutte contre le stress oxydatif cellulaire (Bancarel, 2010).

La seconde réaction de cette voie, transformation du 6-phosphogluconolactone en ribulose-6-phosphate, produit également du NADPH mais, chez les sujets déficitaires en G6PD, elle est totalement perturbée par le ralentissement de la première étape (Figure 3) (Raisonnier, 2004).

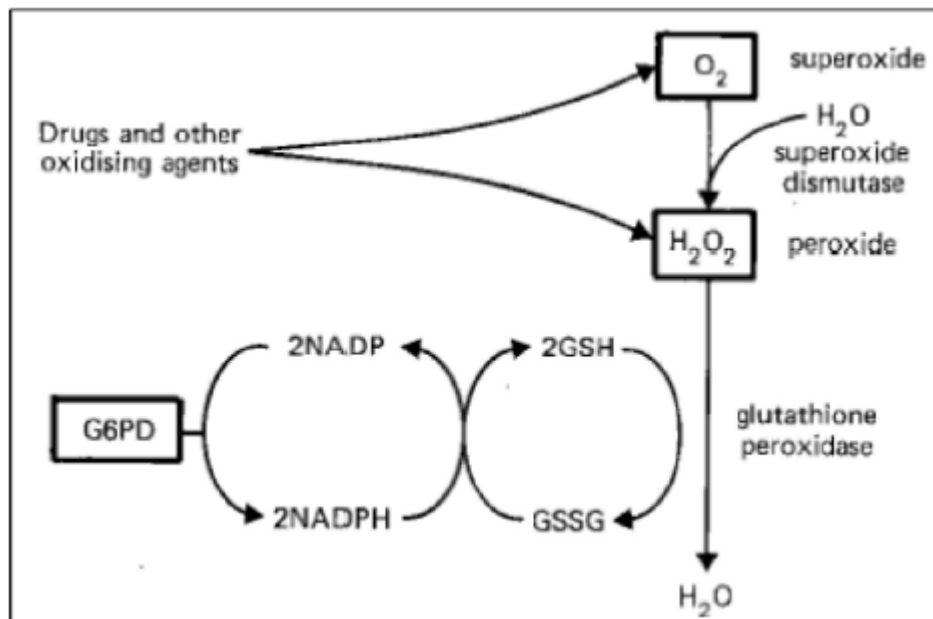


Figure 3 : G6PD protège la cellule contre le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) généré par le stress oxydatif (Yamoul, 2016).

Chapitre III :

Aspects génétique

III.1. Gène G6PD

Le gène qui code pour la G6PD est situé dans la région télomérique du bras long du chromosome X, au locus Xq28 (Figure 4). Il a une longueur de 18 kilobases (kb) et compte 13 exons et de 12 introns (Figure 5), dont la protéine est composée de 515 acides aminés (Srikanth *et al.*, 2020).

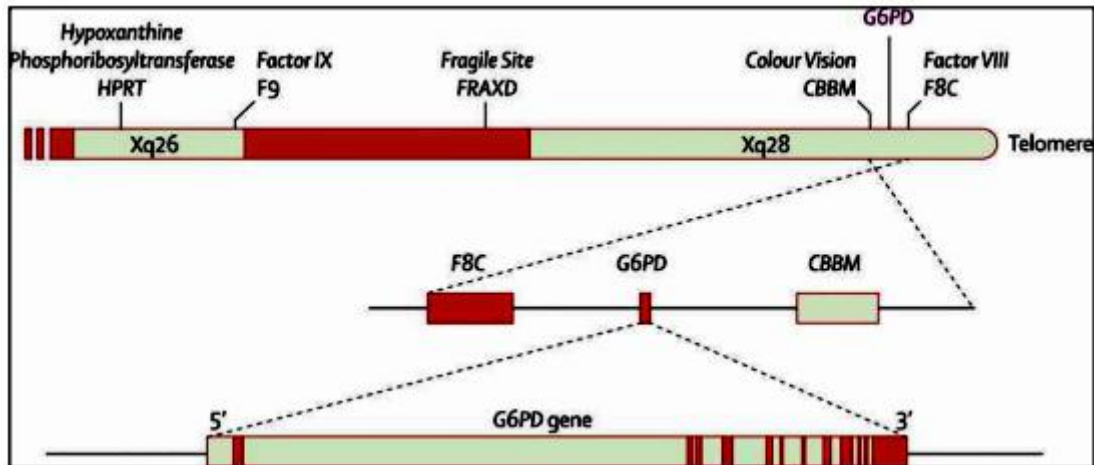


Figure 4 : Localisation du gène de la G6PD sur le chromosome X (Cappellini et Fiorelli, 2008).

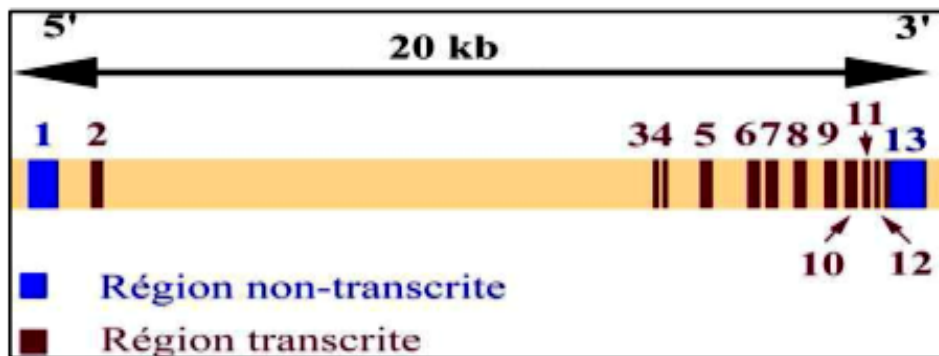


Figure 5 : Gène de la Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (Wajkman et Galacteros, 2004).

III.2. Mutations du gène G6PD

Il existe de nombreuses mutations trouvées dans le gène G6PD, qui sont géographiquement isolés et provoquent une déficience de l'enzyme dans les érythrocytes. Presque toutes les déficiences sont causées par une mutation ponctuelle de l'ADN génomique entraînant une substitution d'acides aminés qui entraîne une réduction de

l'activité de la stabilité de l'enzyme (**Amkha et al., 2021**). En 2018, presque 200 mutations ont été identifiées dans le monde (**Luzzato et Arese, 2018**).

III.3. Mécanisme de transmission

La maladie est transmise sur le mode récessif. Les garçons hemizygotes (ont un chromosome X porteur de l'anomalie et un chromosome Y) et les filles homozygotes (leurs deux chromosomes X sont porteurs de l'anomalie) expriment totalement le déficit (**Bancarel et al., 2010**).

Chez les filles hétérozygotes, l'expression est variable, souvent absent ou modérée et dépendante de la lyonisation du chromosome X (**Lyon, 1961**), Il s'agit d'un processus de compensation génique propre au chromosome X qui aboutit à l'inactivation aléatoire de l'un des deux chromosomes dans chacune des cellules. Pour la majorité des gènes portés par l'X, l'expression d'un seul allèle suffit. Le fonctionnement de cette régulation génique n'est que partiellement compris. La maladie touche donc essentiellement le sexe masculin (90 %) et sa transmission se fait par le sexe féminin en général « porteur sain ». Plusieurs mutations du gène ont été décrites, entraînant la production d'une protéine plus ou moins fonctionnelle (**Bancarel et al., 2010**).

III.4. Variantes de G6PD

Plus de 400 variantes biochimiques de la G6PD ont été caractérisés selon leur activité et leurs propriétés physicochimiques (**Wajckman et Galacteros, 2004**). Les variantes biochimiques de l'enzyme G6PD sont classées en 5 catégories sur la base de l'activité enzymatique et des manifestations cliniques (Tableau 2) (**La Vieille et al., 2019**).

Tableau 2 : Classification des variantes de la G6PD selon leur activité établie par l’OMS (OMS, 2019).

Classe	Critères	Ensemble de variantes
Classe I	Anémie hémolytique chronique, activité enzymatique inférieure à 10 % de la normale ;	Rare
Classe II	Anémie hémolytique intermittente, activité enzymatique inférieure à 10% de la normale ;	Type « méditerranéen »
Classe III	Anémie hémolytique suite à un stress oxydatif, activité enzymatique comprise entre 10 et 60% de la normale ;	G6PD A-
Classe IV	Pas de déficit, activité enzymatique comprise entre 60 et 150% de la normale ;	G6PD B
Classe V	Pas de déficit, activité accrue, supérieure à 150% de la normale.	Rare

La G6PD d'activité normale la plus répandue est celle de type B, avec une activité légèrement plus basse et une mobilité électrophorétique plus rapide, conséquence de la substitution d'un acide aminé (Megarbane, 2008).

- Le variant A est un changement A par G à la position nucléotidique 376 dans l'exon 5, entraînant une mutation faux-sens (Asn par Asp) au niveau de l'acide aminé 126. Le variant A entraîné des niveaux normaux de thermostabilité et d'activité enzymatique, entre 60 et 150%, et est un phénotype de classe IV selon la classification de l'OMS, non associé à une anémie hémolytique aiguë (McDonagh *et al.*, 2012).

- Le variant G6PD A- est le variant le plus répandu du déficit en G6PD en Afrique subsaharienne (Roh *et al.*, 2016). Bien qu'il soit généralement associé à un degré de carence plus léger (activité résiduelle des GR G6PD ~5–13%) par rapport au variant méditerranéen G6PD, et donc à un risque plus faible d'hémolyse, des événements hémolytiques sévères sont connus pour se produire si le déficit oxydatif est suffisamment fort. L'enzyme G6PD A- a un phénotype de classe III selon la classification de l'OMS, conférant un déficit enzymatique modéré entre 10 et 60% d'activité (McDonagh *et al.*, 2012 ; Roh *et al.*, 2016).

- Le variant G6PD A- diffère du variant G6PD A par une seconde mutation et on distingue trois types de mutation :
 - Substitutions G→A en position 202 qui entraînant la mutation faux sens (Val par Met) à l'acide aminé 68.

- Substitutions G→T en position 680 qui entraînant la mutation faux sens (Arg par leu) à l'acide aminé 227.
- substitutions T→C en position 968 qui entraînant la mutation faux sens (Leu par Pro) à l'acide aminé 323 (**McDonagh et al., 2012**).
- Le variant méditerranéen est un changement C par T en position 563 dans l'exon 6, résultant en un changement d'acide aminé Ser en Phe en position 188. Cela confère moins de 10% d'activité enzymatique résiduelle et est associé à l'anémie hémolytique aiguë, et a donc une classification OMS de classe II. Par rapport au type sauvage G6PD B, le variant méditerranéen a une plus grande affinité pour le G6P et une thermostabilité réduite (**McDonagh et al., 2012**).

Chapitre IV :

Diagnostic et

traitement

IV.1. Diagnostic

IV.1.1. Fluorescent spot test

Le « Fluorescent Spot Test » ou « Spot Test de Beutler », est un test biochimique simple de dépistage. Il consiste à faire incuber un hémolysât en présence de glucose-6-phosphate (G6P) et de NADP, puis à en déposer une goutte sur un papier filtre et à l'examiner à la lumière ultra-violette (UV). La production de NADPH est attestée par l'apparition d'une tâche fluorescente. Il s'agit donc d'un test visuel permettant une distinction fiable entre les sujets fortement déficitaires ne présentant pas de fluorescence en lumière UV, et les sujets normaux présentant une fluorescence (Mura *et al.*, 2009).

IV.1.2. Dosage spectrophotométrique de l'activité enzymatique G6PD

Le diagnostic repose classiquement sur le dosage quantitatif spectrophotométrique de l'activité enzymatique érythrocytaire. Il s'effectue sur un prélèvement sanguin réalisé sur anticoagulant (PNDS, 2017).

L'hémolysât est mis en incubation avec du glucose-6-phosphate et un mélange réactionnel contenant du NADP. En présence de NADP, le G6P est oxydé en 6 Phosphogluconolactone par la G6PD. Il y a production concomitante de NADPH, H⁺ qui absorbe à 340 nm, contrairement au NADP. La variation d'absorbance en fonction du temps est proportionnelle à l'activité G6PD. Dans les GR normaux, l'activité G6PD mesurée à 37°C est de 7 à 10 UI/g d'hémoglobine (Mura *et al.*, 2009).

IV.1.3. Test de stabilité de glutathion réduit

Le test de stabilité du glutathion réduit (GSH) lors de l'incubation des hématies en présence d'une substance oxydante, l'acetylphenylhydrazine. Dans le sang du sujet normal, le taux du glutathion réduit s'abaisse peu, alors que l'on observe une chute importante dans le sang des sujets présentant le déficit enzymatique. Ce test mesure le taux de formation de glutathion réduit dans les globules rouges (Diawara, 2005).

IV.1.4. Test de biologie moléculaire par l'étude de l'ADN

L'analyse moléculaire peut être utile pour le dépistage dans la population, les études familiales ou le diagnostic parental, bien que cette approche ne soit pas utilisée de manière systématique. Pour une pratique de laboratoire correcte, le diagnostic moléculaire du déficit en G6PD doit comporter deux étapes analytiques :

Un premier niveau de dépistage, pour rechercher les mutations les plus fréquentes dans une zone géographique spécifique. Dans ce cas, une PCR couplée à une RFLP représente une approche de dépistage moléculaire rapide, valide et fiable (**Minucci et al., 2009**).

Un deuxième niveau, basé sur le séquençage du gène entier, finalisé à l'identification de la mutation moins fréquente, ou nouvelle (**Minucci et al., 2009**).

Ce test décèle là où les mutations génétiques sur l'ADN, montre le génotype de l'individu et permet la connaissance de la variante en cause, mais c'est encore un test coûteux, pratiqué seulement dans certains laboratoires spécialisés.

IV.2. Traitement

IV.2.1. Traitement préventif

L'aspect le plus important de la prise en charge est d'éviter les causes qui précipitent l'hémolyse (**Mehta et al., 2000**) Il convient d'éviter :

- Certains aliments :
 - Les fèves, quelle qu'en soit la forme (surtout les fèves crues).
 - Les boissons contenant de la quinine.
 - de fortes doses de vitamine C (boissons enrichies, compléments alimentaires) (**Vinay, 2004**).
- Certains médicaments : schématiquement, il en existe deux sortes :
 - certains médicaments sont contre indiqués de façon formelle et ne doivent jamais être prescrits chez un déficitaire par exemple les sulfamides ;
 - certains médicaments ne sont dangereux que s'ils sont prescrits à des doses supérieures aux doses usuelles (par exemple l'aspirine) (**Vinay, 2004**).

- Certaines substances ou produits : comme le naphthalène, ou le henné.

Ces médicaments, produits de santé et aliments dangereux pour les déficients en G6PD doivent figurer sur un document que chaque déficitaire et ses parents doivent porter sur eux afin d'être présenté systématiquement à tout professionnel de santé qui sera amené à soigner la personne (médecin traitant, chirurgien, dentiste, infirmière, pharmacien, médecin scolaire, etc.). Il existe une carte officielle de soins, d'information et d'urgence (**Vinay, 2004**).

IV.2.2. Traitement symptomatique

Les hémolyses aiguës chez les personnes déficientes sont généralement de courte durée, et ne nécessite pas de traitement spécifique (**Cappellini et Fiorelli, 2008**).

Dans de rares cas (généralement enfants), l'hémolyse aiguë conduisant à une anémie sévère peut nécessiter des transfusions de GR (**Cappellini et Fiorelli, 2008**).

En cas d'hémolyse chronique, aucun traitement n'est utile, y compris la splénectomie (**ANSM, 2014**).

IV.2.3. Traitement adjuvant

La vaccination contre l'hépatite A a été proposée comme un moyen pour réduire la morbidité associée à l'hémolyse précipitée par une infection (**Mehta et al., 2000**).

L'acide folique à 5 mg par jour est nécessaire à long terme pour les chroniques et doit être administré pendant 2 à 3 semaines après un événement hémolytique aigu (**Mehta et al., 2000**).

Un traitement à long terme à la vitamine E et au sélénium présente l'avantage théorique de réduire les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres (**Mehta et al., 2000**).

Partie pratique

Patients et méthodes

I.1. Cadre d'étude

Notre étude a été réalisée au service de pédiatrie d'établissements publique hospitaliers de la wilaya de Jijel (L'établissement publique hospitalier : Mejdoub Saïd (**Taher**), Mentouri Bachir (**El- Milia**). Le dosage de l'activité G6PD a été effectué au laboratoire d'analyses médicales de Dr. BOUKROUCHE (Jijel) et l'étude génétique a été réalisée au laboratoire de biologie et génétique moléculaire au centre hospitalo-universitaire de Constantine (CHUC) . Ce travaille a pris environ 3 mois (du 25 avril 2021 au 10 juillet 2021). Il s'agit d'une étude approfondie des échantillons sanguins pour rechercher les mutations responsables du déficit en G6PD chez nos patients.

I.2. Population étudiée

La population d'étude est constituée des 4 patients atteints de déficit en G6PD âgés entre 1 an à 5 ans hospitalisés pour une anémie hémolytique au sein du service de pédiatrie pour un traitement d'urgence qui est une transfusion sanguine.

I.3. Critères d'inclusion

Notre étude concerne les patients atteints d'anémie hémolytique, qui se produise après ingestion de substance oxydante (fève).

I.4. Paramètres étudiés

Parmi les paramètres étudiés nous avons établi un questionnaire (Annexe 1) qui a été remplie suite au contact direct avec les parents des patients. Ce questionnaire permet de relever les différentes caractéristiques : transmission de la maladie d'une génération à une autre (Arbres généalogiques), Age, sexe, origine, les facteurs déclenchants, délai d'hospitalisation, l'hémogramme, le test de Coombs et le dosage enzymatique de la G6PD érythrocytaire.

I.5. Méthodes

I.5.1. Hémogramme : l'hémogramme réaliser par un appareille appeler Coulter. Il montre le taux d'hémoglobine (Hb), le volume globulaire moyen (VGM), la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)

I.5.2. Test de Coombs

Test de Coombs Direct (TCD) dénommé également Test Direct à l'antiglobuline (TDA), permet grâce à un sérum d'antiglobuline humaine de révéler la présence d'anticorps à la surface des hématies (agglutination) et susceptible d'entraîner leur destruction (hémolyse).

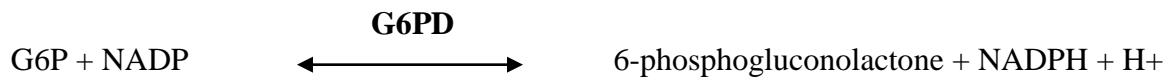
- Si test est positif (anticorps présents), les globules rouges s'agglutinent.
- Si test est négatif (anticorps absents), les globules rouges ne s'agglutinent pas.

I.5.3. Dosage de l'activité enzymatique de la G6PD

- **Principe**

Le dosage de l'activité enzymatique s'effectue par la technique spectrophotométrique qui mesure la variation de l'absorbance à 340 nm.

La G6PD est une enzyme contenue dans les érythrocytes catalyse la 1ère étape de la voie des pentoses phosphates par la transformation du glucose-6-phosphate (G6P) en 6-phosphogluconolactone (6PG) et la réduction du NADP en NADPH (**Annexe 2**).



I.5.4. Extraction d'ADN

I.5.4.1. Principe

Les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique et traités ensuite par un détergent (SDS) et une protéinase K. L'ADN nucléaire est libéré dans le milieu et les protéines qui les sont associés sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol. L'ADN est solubilisé en phase aqueuse par le rapport de la DO à 260nm sur la DO à 280nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) qui doit être compris entre 1.8 à 2 (**Miller et al., 1988**).

I.5.4.2. Préparation des leucocytes

Dans un tube Falcon de 50 ml, on met le sang et complété à 25ml avec le TE 20 :5 et laissé 10 min dans la glace suivie par une centrifugation pendant 10 min à 3900g. (3800

tpm). Le surnageant est aspiré avec la trompe à vide, quelques ml de TE 20 :5 est ajouté au culot et le remettre en suspension avec une pipette stérile puis il est complété à 25ml avec du TE 20 :5 et laissé 10 min dans la glace. Centrifugation dans les mêmes conditions que la première fois, le surnageant est aspiré avec la trompe à vide : Obtention d'un culot des leucocytes (si on veut s'arrêter à ce niveau les mettre dans un tube nunc de 1,5ml avec du TE 10 :1 et les conserver à -20° dans le frigo).

I.5.4.3. Extraction de l'ADN

Le culot des leucocytes a été transféré dans un tube falcon de 15 ml, 3 ml de tampon de lyse (NaCl 400 mM, EDTA 2 mM, Tris 10 mM, PH 8,2) sont ensuite ajoutés en dilacérant le culot avec une pipette stérile suivie par l'ajoute de 200 µl de SDS à 10%E et 100 µl de protéinase K à 10 mg/ml. Le tube est agité sur une roue à 37°C pendant une nuit puis refroidit dans la glace. 1 ml de NaCl 4 M est ajouté et agité rigoureusement à la main, ces derniers sont mis dans la glace pendant 5 min (précipitation des protéines), suivi par une centrifugation pendant 15 min à 2500tpm. Le surnageant est transféré dans un tube Falcon de 15 ml. L'éthanol absolu préalablement refroidi est ajouté en un volume 2 fois le volume du surnageant (environ 8 ml), et agité par retournement du tube plusieurs fois : la pelote d'ADN se forme.

Si la pelote ne se forme pas, il est laissé éventuellement 30 min à -20°C puis récupéré dans un tube nunc à la fin.

I.5.4.4. Solubilisation :

Entre 300 et 1000 µl d'eau distillée sont ajoutés selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée, ensuite laissé une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à la dissolution complète (1 à 2 jours).

I.5.5. PCR-RFLP :

La PCR a été réalisée pour amplifier 2 exons ; exon 4 qui a une taille de 203 pb et exon 5 de taille de 272 pb. Elle a été réalisée dans un volume final de 30 µL.

Pour l'exon 4 le mélange réactionnel total contient 3 µL d'ADN, 3 µL du tampon, 0,6 µL ADN Taq polymérase, 21,6 µL d'eau stérile, 0,6 µl dNTPs et 0,6 µl de chaque oligonucléotide.

Elle est réalisée selon le programme suivant :

Dénaturation pendant 4 min à 94°C, suivies de 35 cycles de 10 s à 94°C pour la dénaturation, hybridation pendant 30s à une température indéterminée (60°C- 63°C) et élongation pendant 30s à 72°C, 7 min à 72°C et une élongation finale pendant 1 min à 30°C.

Pour l'exon 5 le mélange réactionnel total contient 3 µL d'ADN, 3 µL du tampon, 0.6 µL ADN Taq polymérase, 21.6 µL d'eau stérile, 0,6 µl dNTPs et 0,6 µl de chaque oligonucléotide.

Elle est réalisée selon le programme suivant :

Dénaturation pendant 4 min à 94 °C, suivies de 35 cycles de 10 s à 94°C pour la dénaturation, hybridation pendant 30 s à une température indéterminée (62°C-64°C), et élongation pendant 30 s à 72°C, 7 min à 72°C et une élongation finale pendant 1 min à 30 °C.

Le produit PCR sont analysé par RFLP :(Restriction fragment length polymorphism).

Le mélange de la digestion contient : 10 µl du produit PCR, 1 µl d'endonucléase de restriction Hind III pour l'exon 4 et Fok I pour l'exon 5 en présence de 2 µl de tampon et 18 µl de H₂O puis incubé à 37°C pendant 1 h 30 min.

Résultats et discussion

1. Données hématologiques

Se fait dès le premier jour d'hospitalisation et permet de déterminer le traitement approprié (Tableau 3).

Tableau 3 : Présentation des premiers paramètres de l'hémogramme.

	MIN	MAX	MOY	Normes
Hb (g/dl)	5.2	8	6.6	11-16
VGM (fl)	73.6	76.5	75.05	80-100
CCMH (g/dl)	33.2	33.6	33.4	32-36
TCMH (pg)	24.4	25.7	25.05	27-34

Les données hématologiques pour les 4 patients montrèrent une inévitabilité du taux d'Hb du globule rouge dû à la crise hémolytique aigüe.

D'après les résultats de ce tableau, on conclut que les GR sont dans l'état normal, c'est-à-dire il n'y a ni macrocytose ni microcytose.

2. Test de Coombs direct

Pour les 4 cas admis, le test de Coombs était négatif.

3. Dosage de l'activité de la G6PD

Selon les résultats que nous avons obtenus, nous avons constaté que tous les cas ayant un dosage de l'activité G6PD inférieur à la valeur normale (10.01-14.19) (voir tableau 4).

Tableau 4 : Cas présentant une activité accrue de la G6PD.

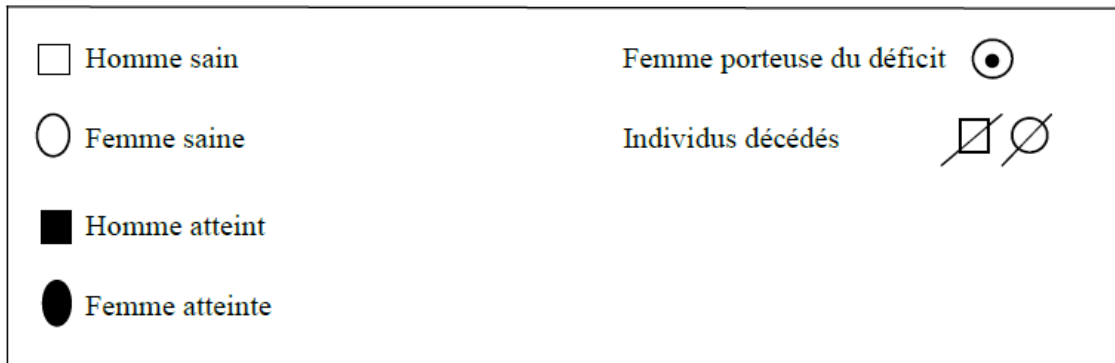
Patients	Dosage G6PD (U/g Hb)	Normes
1	3.36	10.01-14.19
2	3.03	
3	4.20	
4	2.10	

Ces résultats ont confirmé le déficit chez nos patients ainsi selon la classification de l'OMS ils font partie de la classe III où l'activité enzymatique est comprise entre 10 et 60% de la normale (OMS, 2019).

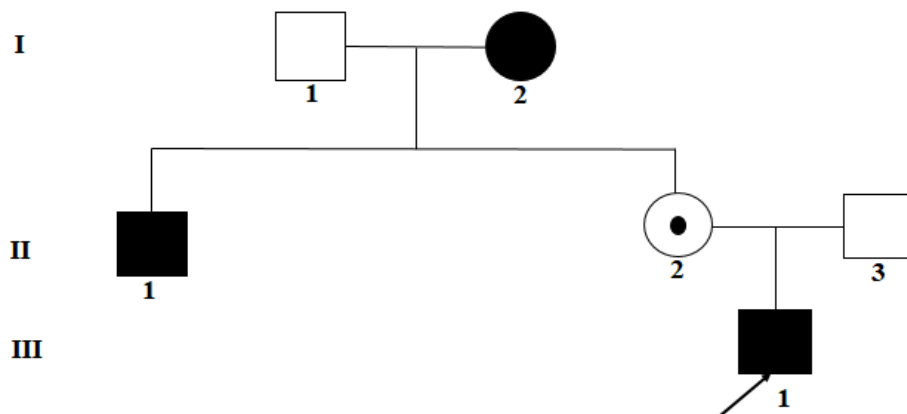
4. Aspect héréditaire

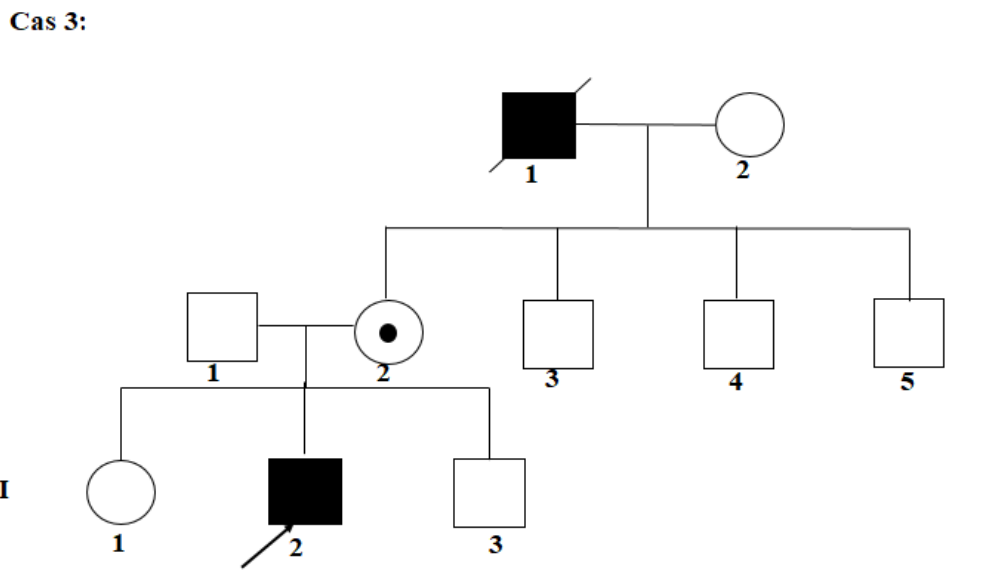
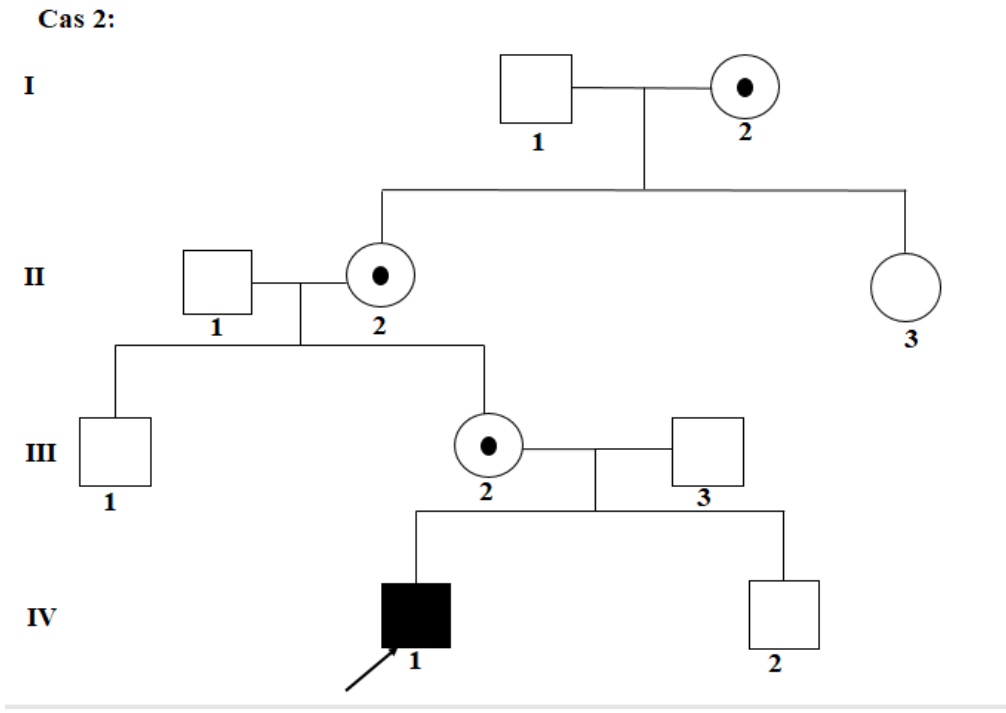
Selon le questionnaire remplis auprès des parents des malades, nous avons les arbres généalogiques suivant :

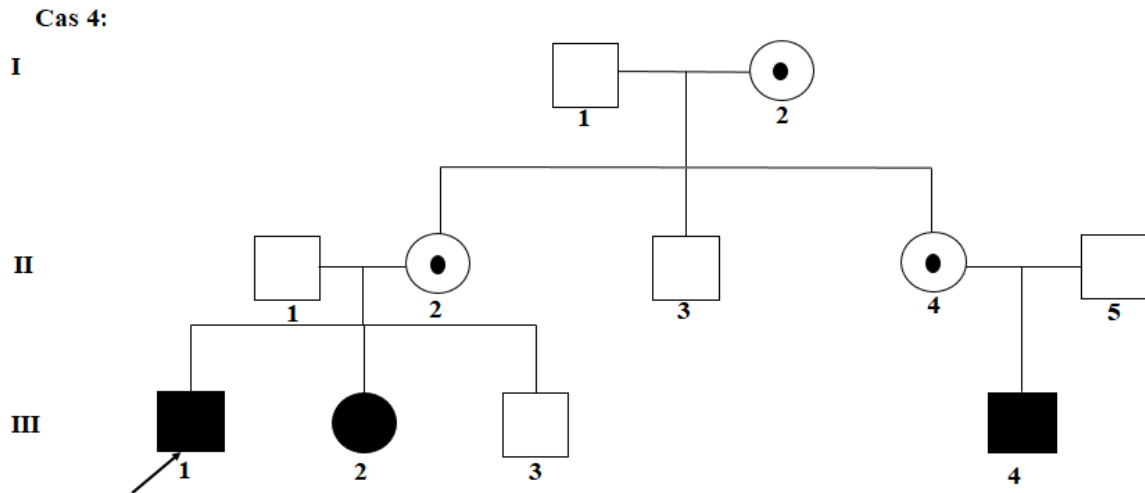
Nomenclature utilisée pour la réalisation des arbres généalogiques :



Cas 1:







- Si la mère à un déficit en G6PD (les deux X est anormal) et le père et normal (son seul X est normal): tous leurs garçons seront déficitaire et tous leurs filles seront transmettrices (cas 1).
- La mère est "transmettrice" du déficit en G6PD (un X est anormal, l'autre X normal) et le père normal (son seul X est normal): il y a une chance sur deux (50%) que chacune de leurs filles soit également transmettrice, et une chance sur deux (50%) que leurs garçons naissent avec ce déficit (cas 2 et 4).
- Si le père à un déficit en G6PD (son seul X est anormal) et que la mère est normal (ses 2 X sont normaux): tous leurs garçons seront normaux alors que leurs filles seront transmettrices. Cela veut dire que les filles d'un mâle déficitaire pourront avoir des enfants déficients (cas 3).

Les résultats de ces arbres généalogiques confirment que le déficit en G6PD est une maladie liée au chromosome X.

5. PCR-RFLP des exons 4 et 5

Compte tenu des circonstances exceptionnelles que traverse le monde entier et en particulier notre pays en raison de la pandémie du Coronavirus (COVID-19) et l'arrivée de la troisième vague, qui était très dangereuse, et due au fait que nos travaux pratiques nous obligeaient à nous déplacer en permanence au CHU de Constantine pour réaliser la technique PCR et la mise au point de la température d'hybridation, nous avons arrêté le travail pratique qui est très important dans notre étude et nous avons analysé quelques recherches sur la même

technologie, identifiant les différentes mutations trouvées dans certains pays de différents continents.

En Algérie, Dans une étude réalisée en 1994 par Nafa et al. En vue d'identifier la mobilité électrophorétique et le niveau d'activité enzymatique de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) chez 100 hommes algériens présentant un déficit en G6PD. L'ADN de ces sujets a été analysé pour la présence de certaines mutations G6PD connues par la digestion par une enzyme de restriction appropriée de fragments amplifiés par PCR.

Les résultats de cette étude ont montré que G6PD A- a un taux de 46% et G6PD Méditerranéenne à un taux de 23% (**Nafa et al., 1994**).

En Tunisie, une étude réalisée par Benansour et al. (2013) sur 423 patients après une hémolyse déclenchée par l'ingestion de fèves, un ictère néo natal ou une hémolyse médicamenteuse. D'autres étaient asymptomatiques mais appartenaient à une famille ayant des antécédents de déficit en G6PD. La détermination de l'activité enzymatique par la méthode spectrophotométrique, a révélé 293 déficients (143 hommes et 150 femmes).

L'analyse moléculaire a été réalisée par une combinaison de PCR-RFLP et de séquençage d'ADN afin de caractériser les mutations à l'origine du déficit en G6PD.

Pour La réaction PCR a été réalisée par l'utilisation de 500 ng d'ADN génomique, 10 pmol de chaque oligonucléotide, 2 mM de dNTP, 15 mM de tampon PCR, 1,25 U d'ADN Taq polymérase et du diméthylsulfoxyde (DMSO 10%) dans un volume final de 50 µl.

Les conditions de cycle utilisées pour l'exon 9 à exon 13 étaient de 5 min à 95 °C pour la dénaturation, suivies de 35 cycles de 1 min à 94 °C pour la dénaturation, 1 min à 56 °C pour l'hybridation, 1 min à 72 °C pour l'elongation et une elongation finale de 7 min à 72 °C.

Pour la PCR du reste des exons (exon 2 à exon 8) 35 cycles ont été effectués avec les paramètres suivants : 5 min à 94 °C pour la dénaturation et cyclage à 94 °C pendant 10 s, 61 °C pendant 30 s, 72 °C pendant 30 s et elongation finale de 7 min à 72 °C. Pour ces recherches, l'ADN des exons 4 et 5 a été digéré par les endonucléases de restriction appropriées, respectivement Fok I et NlaIII. Les fragments digérés ont été séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 8 % et visualisés par coloration au bromure d'éthidium (0, 25 µg / ml).

Cette étude montrée que 14 types génétiques différents ont été identifiés parmi lesquels G6PD A- (376A>G;202G>A) (46,07%) et G6PD Med (33,10%) étaient les variantes les plus fréquents, suivis par G6PD Santamaria (5,80%) et G6PD Kaiping (3,75%) (**Benmansour et al., 2013**).

En Mauritanie, pour déterminer la prévalence des variantes alléliques du G6PD dans les différents groupes ethnolinguistiques présents en Mauritanie, le chercheur Djigo et al. (2019) réalisé à une étude sur un total de 996 échantillons de sang recueillis auprès de patients dans 6 sites d'étude différents.

Dans cette étude, les fragments d'ADN ont été amplifiés par PCR à l'aide de 2,5 à 5 µl d'ADN hybridé avec des paires d'amorces spécifique dans un mélange contenant un Taq-polymérase et le tampon, 2 mM MgCl₂, et les dNTP, tandis que le programme de PCR commença par une étape initiale de 95 °C pendant 5 min, 35 cycles de 95 °C pendant 1 min, 53 °C pendant 1 min, et 72 °C pendant 1 min, puis une extension finale à 72 °C pendant 10 min. Les produits PCR ont été incubés à 37 °C pendant une nuit au moins 18 h avec l'endonucléase Fok I, Après la digestion enzymatique, les amplifions digérés ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, Le fragment de 547 bp couvrant les nucléotides 542, 563 et 680, qui était initialement amplifié, Pour RFLP en utilisant Mbo II pour déterminer le nucléotide 563 dans tous les échantillons, était séquencés si les échantillons porteurs de la mutation A376G ne comportaient ni mutation G202A ni mutation T968C.

Cette étude a montré que la prévalence de la mutation G6PD A- était de 3,6 %, (6,3 % des hommes hémizygotés, 1,5 % des femmes homozygotés, 7,3 % de 549 femmes étaient hétérozygotés). Pour la mutation de type G6PD méditerranéen n'a pas été observé.

La prévalence du déficit en G6PD en Mauritanie est comparable à celle des pays voisins dans le Maghreb (**Djigo et al., 2019**).

Au Soudan, une étude a été menée par Agnieszka et al. (2013) sur 217 individus pour identifier les mutations (G202A et A376G) par PCR en temps réel et PCR- RFLP.

Pour la PCR, les réactions ont été réalisées dans un volume total de 20 µL qui contient 40 ng d'ADN matrice, 4 pM de chaque amorce, 1 × tampon et 0,5 U de Taq polymérase, 1,5 mM MgCl₂. L'amplification a été réaliser avec une dénaturation initiale à 67 °C pour rechercher la mutation G202A et 54 °C pour A375G pendant 5min, puis 37 cycles de dénaturation pour G202A et 35 cycles pour A375G à 94 °C pendant 20 s, L'hybridation des amorces à 53 °C pendant 40 s, et élongation à 72 °C pendant 40 s. L'élongation finale à 72°C pendant 8 min.

Les fragments amplifiés de G202A (364 pb) ont été digérés avec l'endonucléase de restriction Hin 1 II. Pour les tests RFLP, une aliquote de 16 µL du produit PCR a été incubée pendant la nuit à 37°C avec 2 µL de Hin 2 II et 2 µL de tampon.

Les résultats de la PCR-RFLP ont été confirmés par une analyse PCR en temps réel.

Cette étude a montré que dans le nord-est du Soudan, la fréquence du génotype composé G6PD B (202G/376A) était de 90,3 %, tandis que le variant G6PD A (202G/376G) a été trouvé dans 1,4 % de cette population. La fréquence de l'haplotype G6PD A- en Afrique varie de 0 à 25 %. Au Soudan, cette variante est présente chez 7 à 9,9 % de la population (Agnieszka *et al.*, 2013).

Au Portugal (2002), Rodrigues *et al.* ont fait l'analyse de 3 groupes d'échantillons sanguins après un prélèvement au hasard sur des individus de différentes régions au Portugal avec des données cliniques différentes en termes de degré de déficit en G6PD, pour but de découvrir les paramètres biochimiques et dépister les mutations associées à ce déficit à partir de six polymorphismes de longueur de fragment de restriction (RFLP)

Les segments d'ADN ont été amplifiés à l'aide de la PCR dans des conditions favorables représentées par l'utilisation de 100 ng de génome, 35 pmol pour chaque oligonucléotide, 0,2 mM pour chaque dNTP et 0,2 U de Taq-polymérase dans un volume final 50 µL. La PCR comprenant 30 cycles à une température d'hybridation de 58°C pendant 45 secondes pour l'exon 5 et 30 cycles à 60°C pendant 60 (s) pour l'exon 4. Ces segments ont été analysés de la mutation A376G. La digestion enzymatique a été faite par FokI caractéristique du variant A.

Les échantillons digérés étaient analysés pour la mutation G202A caractéristique de G6PD A- par l'endonucléase de restriction NlaIII. Tous les échantillons analysés ont montré les variants suivants : 48,6 % pour la mutation G6PDA- 18 % pour mutation Santa Maria, 9 % pour la mutation G6PD B, 6,1 % pour la mutation G6PD méditerranéenne et 12,3 % pour la mutation G6PD Seattle, et 3% pour la mutation Gaohe avec une nouvelle mutation G6PD Flores (Rodrigues *et al.*, 2002).

En Colombie, Valencia *et al.* (2016) ont réalisé une étude préliminaire, visant à évaluer la prévalence du G6PD sur 426 volontaires chez les zones d'endémie paludique en mesurant le phénotype et les génotypes du G6PD.

Des échantillons de sang ont été prélevés pour évaluer l'activité enzymatique du G6PD, des échantillons d'ADN ont été analysés par PCR-RFLP.

Toutes les réactions PCR ont été réalisées jusqu'à un volume final de 12,5 µL, le programme était : 94 °C pendant 5 min, 35 cycles de 95 °C pendant 30 s, 62 °C/30 s et 72 °C pendant 30s, et extension finale à 72 °C pendant 5 min pour les régions incluant les mutations 376 A>G et 202 G>A. Ces conditions sont similaires pour la région incluant la mutation 563C-T, sauf pour l'hybridation et le temps d'élongation qui étaient de 45 s. Enfin, les produits PCR ont été détectés dans 3 % de gels d'agarose.

les produits PCR ont été utilisés dans RFLP avec des enzymes de restriction spécifiques. La mutation 376 A>G a été identifiée à l'aide de l'enzyme Fok I, la transition G>A 202 a été détecté par l'enzyme de restriction avec NlaIII, ainsi que MobII a été utilisé pour détecter la mutation 563 C>T. Les produits digérés ont été analysés par électrophorèse sur 3 % de gels d'agarose.

Cette étude a montré que les allèles A de G6PD étaient les plus fréquents (15,23 %), notamment à Buenaventura et Tumaco (**Valencia et al., 2016**).

En Arabie Saoudite, un total de 2100 sujets Saoudiens de sexe masculin ont été dépistés par Alharbi et Ali Khan en 2014 pour détecter la présence des mutations G202A et A376G sur les exons 4 et 5 respectivement, par l'utilisation de PCR-RFLP.

La PCR a été réalisée par l'utilisation de 110 ng d'ADN des patients et des amorces spécifiques. Le cycle thermique a impliqué une dénaturation préliminaire à 95°C pendant 5 min, suivie de 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 s, pour à 60°C d'hybridation pendant 30 s et d'élongation à 72C pendant 45 s, suivis d'une étape d'élongation finale à 72C pendant 5 minutes Pour la mutation G202A, l'exon 4 et une dénaturation à 95C pendant 5 min, suivie par par 35 cycles de dénaturation à 95C pendant 30 s, pour l'exon 5 l'hybridation des amorces à 62°C pendant 30 s et d'une élongation à 72C pendant 45 s, suivis d'une étape finale d'élongation à 72C pendant 5 min pour la mutation A376G.

Pour la RFLP, 10 U des enzymes de restriction de restriction NlaIII et FokI ont été incubées avec 15 ml de produits PCR pendant 2 heures.

Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3,5 %, colorés avec du bromure d'éthidium, et quantifiés par transillumination ultraviolette.

Parmi les 2100 sujet (4,76%). 100 sujets ont présenté un déficit en G6PD. La mutation G6PD A- (présence de G202A et A376G) a été observée chez 2 sujets (2 %) parmi les 100 sujets présentant un déficit en G6PD. Cette étude confirme l'existence de la forme africaine de la maladie dans la population saoudienne en un faible taux (**Alharbi et al., 2014**).

En Irak, une étude réalisée en 2014 par Kashmoola et al. A porté sur la prévalence et la caractérisation moléculaire dans plusieurs régions du pays, au nord-ouest de l'Irak concernant la base moléculaire de cette enzymopathie héréditaire.

Pour déterminer la base moléculaire des variants déficients en G6PD dans la province de Ninive, un total de 61 individus masculins déficients ont été enrôlé dans cette étude.

L'ADN de tous les individus a été extrait et analysé pour détecter quatre variantes moléculaires par l'utilisation de la méthode de réaction en chaîne par polymérase avec

polymorphisme (PCR/RFLP). Il a été constaté que 46 (75,41 %) étaient G6PD-Méditerranée, 1(1,64 %) était G6PD-Chatham, 1(1,64 %) était G6PD-A-, et 13 (21,31 %) non caractérisés. Cette étude a montré que les G6PD-A- constituent la moins fréquence de variantes déficientes en G6PD dans sa prévalence (**Kashmoola et al., 2014**).

Parmi les études qui ont été faite on observe que la fréquence de déficit en G6PD A- est plus fréquent dans les pays africain où il est présenté dans l'Algérie 46 %, Tunisie 46.07 et en Mauritanie elle est comparable à celle des pays voisins dans le Maghreb, il est aussi plus fréquemment au Portugal 48.6% ; par contre il est moins fréquent en Colombie 15.23%, Arabie saoudite 2 % et en Irak 1.64 %.

Ces différences entre les études peuvent être dues grâce la variation des critères génétique entre les populations ainsi que les technique utilisées pour découvrir les mutations associés au déficit en G6PD.

Conclusion

Le G6PD est une protéine (enzyme) qui aide au bon fonctionnement des cellules de l'organisme, ils permettent l'élimination des substances qui sont néfaste pour eux, ces substances sont dites stress oxydatifs.

Le déficit en G6PD est l'enzymopathie érythrocytaire la plus répandue dans le monde et aussi appeler favisme. C'est une maladie héréditaire liée au sexe, portée par le chromosome X, il peut entraîner une hémolyse aiguë lors de l'exposition à un médicament ou produit oxydant ou bien suite à l'ingestion de fèves (favisme), sera confirmé par le dosage de l'activité enzymatique. Il touche environ 420 millions de personnes dans le monde avec de nombreuses variantes moléculaire et les plus fréquent sont le variant A- dans les pays africains, il est aussi présent dans des pays méditerranéen, européens et américains avec des fréquences variables, et le variant méditerranéen dans les populations du pourtour méditerranéen. La transmission de cette pathologie est liée au chromosome X cela confirmé par l'examen des arbres généalogiques. Ce travail a été fait pour étudier la distribution de la mutation africaine de G6PD dans les pays africains et les autres pays.

Après avoir effectué le dosage de l'activité enzymatique de nos échantillons, nous avons trouvé que nos patients présentent une activité basse et qui font partie de la classe III selon la classification de l'OMS.

La purification de l'ADN des échantillons pour la recherche de la forme africaine n'a pas eu lieu en raison de la pandémie Covid-19.

D'après les résultats des études antérieures nous avons constaté que la forme africaine en Algérie, Tunisie, Mauritanie et au Portugal présentent une fréquence aux alentours de 46%, par contre elle est moins fréquente en Colombie 15.23%, Arabie saoudite 2 % et en Irak 1.64%.

Pour éviter les cas d'hémolyse surtout grave, les patients doivent éviter tout facteur pouvant déclencher de graves manifestations cliniques de la déficience. Nous faisons trois recommandations particulières. Premièrement, lorsque la clinique et les résultats hématologiques font suspecter la déficience en G6PD, le trouble doit être confirmé par mesure spectrophotométrique quantitative de l'activité enzymatique des globules rouges. Deuxièmement, les patients présentant un déficit en G6PD doivent éviter l'exposition aux médicaments oxydants et ingestion des fèves, et ils doivent être informés de tout risque d'épisodes de l'hémolyse et comment reconnaître ces épisodes. Finalement, les nouveau-nés

doivent être testés pour le déficit en G6PD s'ils ont des antécédents familiaux d'hémolyse ou si la présence de la jaunisse suggère la possibilité du trouble.

Références bibliographiques

A

AFSSAPS. (2008). Médicaments et déficit en Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD). *SaintDenis Cedex Boulevard Anatole France*, P. 64-83.

Agnieszka, K-P., Oktawian, K. , Arleta, D., Mariusz, K., Mirosław, P., Miłosz, P., Malgorzata, M. (2013). Analysis of the genetic variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase in inhabitants of the 4th Nile cataract region in Sudan. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 50 :p. 115-118.

Alharbi, k., Ali Khan, I. (2014). Prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and the role of the A variant in a Saudi population. *Journal of International Medical Research*, 42(5) : p. 1161–1167.

Amkha, S., Chalisa, L.C, Naly, K., Onekham, S., Issarang, N., Kamonlak, L. (2021). Molecular characterization of G6PD mutations reveals the high frequency of G6PD Aures in the Lao Theung population. *Malaria Journal*, 20.

ANSM. (2014). Médicaments et déficit en Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD), 24 pages

ANSM. (2014). Référentiel sur les médicaments et le déficit en Glucose-6-Déshydrogénase, 2 pages

Aydemir, D., Ulusu, N.N. (2020). Is glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme deficiency a factor in Coronavirus-19 (COVID-19) infections and deaths? *Pathog Glob Health*. 114(3): P. 109–110.

B

Baker, D.L, baker, M.W. (2013). The truth about living with G6PD deficiency. *CreateSpaceindependent Publishing Platform*, p. 120.

Bancarel, J., Causse-Le-Dorze, P., Traccard, C. (2010). Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase : Intérêt du dépistage systématique dans les forces de l’armée. *Médecine et armée*, 38(1) : p. 125-130.

Benmansour, I., Moradkhani, K., Moumni, I., Wajcman, H., Hafsia, R., Ghanem,G., Abbès, S., Préhu, C. (2013). *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 50 : p. 110–114

Beauverd, Y., Adam, Y., Assouline, B., Samii, K. (2020). L’infection au Covid-19 et le traitement par l’hydroxychloroquine provoquent une grave crise d’hémolyse chez un patient présentant un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase. *European journal of Haematology*, 105(3): P. 357-359.

Beutler, E. (1959)., The hemolytic effect of primaquine and related compound. *Blood*, 14: p. 103-139.

C

Cappellini, M., Fiorelli, G. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The Lancet*, 371: P. 64-74.

Christensen, R.D. (2018). Neonatal erythrocyte disorders., *In Avery's Diseases of the Newborn*, 10Th edition, P. 1152-1179.

D

Desroches, P., El Shazly, E., Mandon, N., Duc, G., Huignard, J. (1995). Development of *Callosobruchus chinensis* (L.) and *C. maculatus* (F.) (Coleoptera: bruchidae) in seeds of *Vicia faba* L. differing in their tannin, vicine and convicine contents. *Journal of Stored Products Research*, (31) : p. 83-89.

Diwara, A. (2005). Le Déficit en G6PD chez les donneurs de sang du C.N.T.S. de Bamako. Thèse de doctorat : Docteur en Pharmacie et d'Odonto-stomatologie. Université de Bamako, 29 p.

Diop, S., Thiam, D., Sene, A., Cisse M., Fall, K., Toure-Fall A, *et al.* (200). Association drépanocytosedéficit en G6PD. Prévalence et influence sur le profil évolutif. *Médecine d'Afrique Noire*, 47(7): p. 322-326.

Djigo, O. K. M., Ould Ahmedou Salem, M. S., Diallo, S, M., Abdallahi Bollahi, M., Boushab, B, M., Garre, A., Papa Mze, N., Basco, L., Briolant, S., Ould Mohamed Salem Boukhary, A. (2021). Molecular Epidemiology of G6PD Genotypes in Different Ethnic Groups Residing in Saharan and Sahelian Zones of Mauritania. *Pathogen*, 10, p 931.

H

Ho, L., John, R.M. (2015). Understanding and Managing Glucose-6-Phosphate Dehydrogénase Deficiency. *The Journal for Nurse Practitioners*, 11: p. 443-450.

Hofmann, S., Buser, A., Taegtmeier, A. (2016). Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase. *In Forum Medical Suisse* 16 (10), 241-244.

Howes, RE., Dewi, M., Piel, FB., Monteiro, WM., Battle, KE., Messina, JP., Sakuntabhai, A., Satyagraha, AW., Williams, TN., Baird, JK., Hay, SI. (2013). Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. *Malaria journal*, 12: P. 418.

K

Kaddari, F., Sawadogo, M., Sancho, J., Lelong, M., Jaby, D., Paulin, C., et al. (2004). Dépistage néonatal du déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) sur sang de cordon. *Analyse de biologie clinique*, 62 : p. 50-446

Kashmoola, M. A., Eissa, A. A., Al-Takay, D. T., Al-Allawi, N. A. (2014). Molecular Characterization of G6PD Deficient Variants in Nineveh Province, Northwestern Iraq. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 31 (1):p. 133-136.

Kirkman, H.N., Hendrickson, E.M. (1962). Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes. *J Biol Chem*, 237(7): p. 2371-2376.

Kaplan, M., Renbaun, P., Levy-Lahad, E., Hammerman, C., Lahad, A., & Beutler, E. 1997. Gilbert syndrome and glucose-6-Phosphate deshydrogenase deficiency: a dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 94: P. 12128-12132.

Kaplan, M., Hammerman, C., Bhutani, V.K. (2016). The preterm infant: a high-risk situation for neonatal hyperbilirubinemia due to glucose-6-phosphate deshydrogenase deficiency. *Clinics in perinatology*, 43: P. 325-340.

L

La vieille, S., Lefebvre, D. E., Khalid, A. F., Decan, M. R., & Godefroy, S. (2019). Dietary restrictions for people with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Nutrition reviews*, 77(2): p. 96-106.

Luzzatto, L., Arese, P. (2018). Favism and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *The new England journal of medicine*, 378: p. 60-71.

Luzzatto, L., Arese, P. (2018). Favism and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *The new England journal of medicine*, 378: p. 1067-1069.

Lyon, M.F. (1961). Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, 190 : P. 372-373.

M

Mason, P.J., Bautista, J.M., Gilsanz, F. (2007). G6PD deficiency: the genotype phenotype association. *Blood Reviews*, 21: P. 267-283.

McDonagh, E.M., Thorn, C.F., Bautista, J.M., Youngster, I., Altman, R.B., Klein, T.E. (2012). PharmGKB summary: very important pharmacogene information for G6PD. *Pharmacogenet Genomics*, 22: P. 219_228.

Mégarbane, B. (2008). Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase : quand y penser et quelles précautions prendre ? Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Société de réanimation de langue française*, 17 : p. 399-406.

Mehta, A., Mason, P. J., & Vulliamy, T. J. (2000). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Best practice & research clinical hematology*, 13(1): p. 21-38.

Meiling, C., Hungyao, H., Chiming, L., Yihung, C., Arnold, S., Daniel, T. (2000). Cellular glucose- 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) status modulates the effects of nitric oxide (NO) on human foreskin fibroblasts. *Biological Medicine*, 475(3): p. 257-262.

Meletis, J., Konstantopoulos, K. (2004). Favism – from the ‘avoid fava beans’ of Pythagoras to the present Haema, 7: p. 17-21.

Minucci, A., Giardina, B., Zuppi, C., Capoluongo, E. (2009). Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay. *How, When, and Why? Life*, 61 : p. 27-34.

Mura, M., Saidi, R., Wolf, A., Moalic, J.L., Oliver M. (2009). Anémie hémolytique congénitale par déficit en Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase. *Medicine tropical*, 69 (6): P. 551-555.

N

Nafa, K., Reghis, A., Osmani, N., Baghli, L., Aït-Abbes, H., Benabadji, M., ... & Luzzatto, L. (1994). At least five polymorphic mutants account for the prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Algeria. *Human genetics*, 94(5), 513-517.

Nagalla, S., MBBS., MS., FACP. (2020). What is the genetic etiology of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency?

Naylor, C.E., Rowland, P., Basak, K., *et al.* (1996). Glucose 6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme. *Blood*, p. 2974-2982.

Nguyen, T.H., Jean, P.C., Tran, T.H.C., Nick, D., Jeremy, J.F., Tran, T.H., Sarah, J.D. (2009). Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) mutations and haemoglobinuria syndrome in the Vietnamese population, *Journal du paludisme*, 8.

Notaro, R., Afolayan, A., Luzzatto, L. (2000). Human mutations in glucose-6-phosphate dehydrogenase reflect evolutionary history. *The FASEB Journal*, 14: p.485-494

Nouri, D.M., Danesh, P.M (2008). Molecular basis of G6PD deficiency. *Acta Medica Iranica*, 46 : P. 167-182.

O

OMS. (1990). Déficit en glucose-6-phosphate. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 68 : p.13-24.

P

Pavlik, M., Vanova, M., Laudova, V., Harmatha, J. (2002). Fungitoxicity of natural heterocycle glucoside vicine obtained from *Vicia faba* L. against selected filamentous fungi. *Rostlinna Vyroba*, 48 : p. 543-547.

Pissard, S. (2014). Le déficit en G6PD et en Pyruvate kinase érythrocytaire : physiopathologie et diagnostic., 4(1).

PNDS. (2017). Déficit en G6PD (Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase) ou favisme. <https://biorecos.fr/deficit-en-g6pd-glucose-6-phosphate-deshydrogenase-ou-favisme-pnds-2017/>

PNDS. (2017). Déficit en G6PD (Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase) ou favisme. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-10/deficit_en_g6pd_-_pnds.pdf

R

Raisonnier, A. 2004. Biochimie métabolique et Régulations C1. *Réserves Energétiques*. P :112-114.

Rodrigues, M, O., Ponces Freire, A., Martins, G., Pereira, J., Martins, M, D, C., Monteiro, C. (2002). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Portugal: Biochemical and mutational profiles, heterogeneity, and Haplotype Association. *Blood cells, Molecules, and diseases*, 28(2), p: 249_259.

Roh, M.E., Oyet, C., Orikiriza, P., Wade, M., Amumpaire, J.M., Boum, Y.II., Kiwanuka, G.N., Parikh, S, (2016). Screening for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Using Three Detection Methods: A Cross-Sectional Survey in Southwestern Uganda. *Official journal of the American society of tropical Medecine and hygiene*, 95: P. 1094–1099.

S

Salati, L.M., Amir-Ahmady, B. (2001). Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Annual review of nutrition*, 21: p. 121-140.

Salvador, A., Savageau, M. (2003). Quantitative evolutionary design of glucose 6-phosphate dehydrogenase expression in human erythrocytes. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States America*, 100: p. 14463-14468.

Sanephonasa, A., Cheepsunthorn, C.L., Khaminsou, N., Savongsy, O., Nuchprayoon, I., Leecharoenkiat, K. (2021). Molecular characterization of G6PD mutations reveals the high frequency of G6PD Aures in the Lao Theung population. *Malaria Journal*, 20.

Shannon, W.A., Sheila, G., Veronica M.L., Margaret, J.A. (2000). Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Elsevier Science Lt.*, 8(3) : p. 293-303.

Siqueira, M., Elyassi, A., Rowshan, H. (2014). G6PD deficiency in Latin America. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(5): p. 553–568.

Srikanth, N., MBBS., MS., FACP. (2020). What is the genetic etiology of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency?

V

Valencia, S, H., Ocampo, I, D., Arce-Plata, M, I., Recht, J., Arevalo-Herrera, M. (2016). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency prevalence and genetic variants in malaria endemic areas of Colombia.

VIGIFAVISM. (2009). Déficit en G6PD. *Association française des personnes atteintes du déficit en G6PD*, P. 1

VIGIFAVISM. (2008). Informations et conseils. Déficit en Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD) ou favisme.

Wacjman. H., Jolly. D. (2009). VIGIFAVISM. Quels sont les tests biologiques de diagnostic ?

Vinay, A.P : projet « Tous à l'école ». (2004), Disponible sur : <http://www.tousalecole.fr/content/qui-sommes-nous-0#simple-table-of-contents-3>,

W

Wajcman, H., Galacteros, F. (2004). Le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase. *Protection contre le paludisme et risqué d'accidents hémolytiques. Comptes Rendus Biologies*, 327 : p. 711-720.

WGW. (1989). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bulletin of the World Health Organization*, 67 (6): p. 601-611.

Y

Yamoul, M. (2016). Anémie hémolytique par déficit en g6pd chez l'enfant à propos de 30 cas. Thèse: en médecine. Université Mohammed v- rabat, 125p.

Annexes

Annexe 1 : Questionnaire

**Université Mohamed Seddik
Ben Yahia - JIJEL**
**Département de biologie moléculaire
et cellulaire**

**Centre hospitalo-universitaire de
Constantine**
**Laboratoire de biologie et génétique
moléculaire**

Interrogatoire du malade

1.	Nom et Prénom :	Date d'hospitalisation
2.	Date de naissance :	Groupage :
3.	Adresse :	Nº de téléphone :
4.	Age de découverte de l'anémie : 1ans <input type="checkbox"/> 2ans <input type="checkbox"/> plus <input type="checkbox"/>	8. Le bébé a eu un ictère après sa naissance oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
5.	Est-ce que l'anémie est produite après avoir mangé un type particulier de légumineuses : oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>	9. l'ictère a duré combien de jours une semaine <input type="checkbox"/> deux semaines <input type="checkbox"/> plus <input type="checkbox"/>
6.	Y a t-il eu l'anémie après la prise d'un certain type de médicament oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>	10. Y a t-il d'autres personnes dans la famille souffre du déficit en G6PD oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
7.	Si oui quel est le nom de ce médicament.....	11. Valeur du dosage de l'activité de G6PD

Le pedigree

Annexe 2 : Fiche technique de la méthode de dosage de l'activité G6PD



BIOLABO
www.biolabo.fr

FABRICANT :
BIOLABO SAS,
Les Hautes Rives
02160, Maizy, France

G6-PDH Méthode cinétique U. V.

Réactif pour le dosage quantitatif de l'activité Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6-PDH)
[EC 1.1.1.49] dans le sérum humain, le plasma ou les érythrocytes.

REF 97089 R1 2 x 30 mL R2 1 x 3 mL R3 1 x 20 mL

CODE CNQ : XX

SUPPORT TECHNIQUE ET COMMANDES

Tel : (33) 03 23 25 15 50

Fax : (33) 03 23 256 256



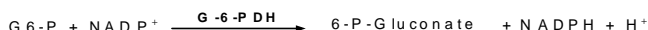
IVD USAGE IN VITRO

INTERET CLINIQUE (1) (2)

La Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6-PDH) est une enzyme contenue dans les érythrocytes et intervenant dans la glycolyse. Différents variants de G6-PDH, définis selon leurs profils électrophorétiques et cinétiques, sont fréquemment rencontrés et ont des conséquences cliniques dans différents groupes ethniques. Une déficience en G6-PDH peut conduire à une anémie hémolytique suite à l'ingestion de 8-aminoquinoline antimalarienne, d'acide nalidixique, de nitrofurantoïne, phénacétine, de forte dose de vitamine C ou de certains sulfonamides ou sulfones. La déficience peut entraîner la maladie hémolytique du nouveau-né dans les populations asiatiques et méditerranéennes.

PRINCIPE (4) (5).

Le schéma de la réaction (méthode de Beutler et al.) est le suivant :



L'augmentation de la concentration en NADPH mesurée à 340 nm est proportionnelle à l'activité G6-PDH dans le spécimen.

REACTIFS

flacon R1 TAMPON COENZYME

Tampon Tris pH 8,0	100 mmol/L
MgCl ₂	10 mmol/L
EDTA	0,5 mmol/L
NADP ⁺	310 mmol/L
Azide de sodium	3 %

flacon R2 SUBSTRAT

Glucose 6 phosphate	0,6 mmol/L
---------------------	------------

Flacon R1 et R2 : Avant reconstitution : Xi, R36/37/38

Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau.

Flacons R1 et R2 : Avant reconstitution : T, R28-32-50/53

Très toxique en cas d'ingestion. Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.

Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

S22-26-28, 38 : Ne pas respirer les poussières, en cas de contact avec les yeux ou la peau rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. En cas de ventilation insuffisante, porter un appareil respiratoire.

Flacons R1 et R2 : Après reconstitution : Néant

flacon R3 SOLUTION HEMOLYSANTE

Digitonine	0,2 g/L
------------	---------

PRECAUTIONS

Les réactifs BIOLABO sont destinés à du personnel qualifié, pour un usage in vitro.

- Vérifier l'intégrité des réactifs avant utilisation.
- Utiliser des équipements de protection (blouse, gants, lunettes). Ne pas pipeter avec la bouche.
- En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment à l'eau et consulter un médecin.
- Les réactifs contiennent de l'azide de sodium (concentration < 0,1%) qui peut réagir avec les métaux tel que le cuivre ou le plomb des canalisations. Rincer abondamment.
- La fiche de données de sécurité peut être obtenue sur simple demande.
- Elimination des déchets : respecter la législation en vigueur.

Par mesure de sécurité, traiter tout spécimen comme potentiellement infectieux. Respecter la législation en vigueur.



PREPARATION DES REACTIFS

Ajouter sans délai 30 mL d'eau déminéralisée ou distillée au contenu du flacon R1 (Tampon Coenzyme).

Ajouter sans délai 3 mL d'eau déminéralisée ou distillée au contenu du flacon R2 (Substrat).

Agiter doucement jusqu'à complète dissolution avant d'utiliser les réactifs (environ 2 minutes).

La solution hémolysante (flacon R3) est prête à l'emploi.

STABILITE ET CONSERVATION

Stocker à 2-8°C, bien rebouché dans le flacon d'origine et à l'abri de la lumière.

- Avant ouverture, stockés et utilisés comme indiqué dans la notice, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
 - Les réactifs de travail (flacon R1 et R2) sont stables au moins un mois en l'absence de contamination.
 - Ne pas utiliser les réactifs de travail après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Ne pas utiliser les réactifs s'ils sont troubles.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DU SPECIMEN (1)

Sérum non hémolysé, plasma (hépariné ou EDTA). L'oxalate et le fluorure ne doivent pas être utilisés.

Erythrocytes : Utiliser un hémolysat de sang total préparé comme suit :

(Mode opératoire détaillé disponible sur demande)

1. Déterminer le taux d'hémoglobine (Hb en g/dL).
2. Laver 3 fois 0,2 mL de sang homogénéisé avec 2 mL de NaCl à 9 g/L. Centrifuger entre chaque lavage et éliminer le surnageant (veiller à ne pas éliminer d'érythrocytes).
3. Après le dernier lavage, remettre les érythrocytes en suspension dans 0,9 mL de solution hémolysante (flacon R3).
4. Placer 15 minutes à 2-8°C puis centrifuger à nouveau. Utiliser le surnageant (Hémolysat) dans l'heure qui suit.

INTERFERENCES (2) (3)

Ce dosage reflète également l'activité de la 6-Phosphogluconate déshydrogénase (6-PGD) laquelle génère une molécule de NADPH par molécule de 6-Phosphogluconate formée.

Young D.S. a publié une liste des substances interférant avec le dosage.

REACTIFS ET MATERIEL COMPLEMENTAIRES

1. Equipement de base du laboratoire d'analyses médicales.
2. Sérums ou hémolysats de contrôle normaux et pathologiques

CALIBRATION

La validité des résultats dépend de l'exactitude de la calibration de l'instrument, du juste décompte du temps, du respect du rapport volume réactif / volume spécimen et du contrôle de la température.

Il est recommandé d'utiliser le facteur théorique (§ CALCUL) ou d'utiliser un calibrateur raccordé sur une méthode de référence ou un hémolysat de référence.

CONTRÔLE DE QUALITE

CODE CNQ : XX

- **REF** 95089 Contrôle Normal G6-PDH
- **REF** 95289 Contrôle Déficient G6-PDH
- Tout sérum de contrôle humain ou échantillon de sang total titré pour cette méthode.
- Programme externe de contrôle de la qualité.

Il est recommandé de contrôler dans les cas suivants :

- Au moins un contrôle par série.
- Au moins un contrôle par 24 heures.
- Changement de flacon de réactif.
- Après opération de maintenance sur l'analyseur.

Lorsqu'une valeur de contrôle se trouve en dehors des limites de confiance recommandées, appliquer les actions correctives suivantes :

1. Répéter le test en utilisant le même contrôle.
2. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, préparer un contrôle fraîchement reconstitué et répéter le test.
3. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, vérifier les paramètres de l'analyse : longueur d'onde, température, volume spécimen/volume réactif, temps de mesure et facteur de calibration.
4. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, utiliser un autre flacon de réactif et répéter le test.
5. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, contacter le service technique BIOLABO ou le revendeur local.

INTERVALLES DE REFERENCE (2)

Dans les érythrocytes à 37°C

Unités conventionnelles	Unités internationales
UI/g d'Hb : 12,1 ± 2,09	MUI/mol d'Hb : [0,78 ± 0,13]
UI/10 ¹² Erythrocytes : 351 ± 60,6	nUI/Erythrocytes : [0,35 ± 0,06]
UI/mL d'érythrocytes : 4,11 ± 0,71	KUI/L d'érythrocytes : [4,11 ± 0,71]

Il est recommandé au laboratoire de définir ses propres valeurs usuelles.

Dans le sérum à 37°C

Valeurs normales : Activité G-6-PDH non détectable

PERFORMANCES

Etudes réalisées avec hémolysats.

Intra-série N = 18	Taux bas	Taux élevé	Inter-série N = 15	Taux bas	Taux élevé
Moyenne U/10 ¹² Erythrocytes	264	537	Moyenne U/10 ¹² Erythrocytes	276	535
S.D. U/10 ¹² Erythrocytes	13,6	23,7	S.D. U /10 ¹² Erythrocytes	16,0	25,5
C.V. %	5,2	4,4	C.V. %	5,8	4,8

Limite de détection : environ 31 U/10¹² Erythrocytes.

Comparaison avec réactif du commerce :

$$y = 1.0271 + 13.1 \quad r=0.9933$$

LIMITE DE LINEARITE

Si Δ Abs/min > 0,060, diluer le spécimen (sérum, plasma, hémolysat) avec une solution NaCl à 9 g/L et refaire le dosage en tenant compte de la dilution dans le calcul du résultat. La limite de linéarité dépend du rapport de volume spécimen/réactif.

MODE OPERATOIRE (TECHNIQUE MANUELLE)

Ramener les réactifs et échantillons à température ambiante.

Distribuer dans des cuves de lecture thermostatées à 37°C (30°C, 25°C) :	Dosage sur Sérum	Dosage sur Hémolysat (1)
Réactif 1	2 mL	3 mL
Sérum	1 mL	
Hémolysat		50 µL
Mélanger et incubé 5 minutes à 37°C (30°C, 25°C)		
Réactif 2	100 µL	100 µL

Mélanger et lire l'absorbance initiale après 30 secondes à 340 nm puis toutes les minutes pendant 3 minutes.
Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minute (Δ Abs/min). Si l'activité est faible, le temps de mesure peut être allongé.

Remarque :

1-Préparation de l'hémolysat : voir § **PRELEVEMENT ET PREPARATION DU SPECIMEN.**

CALCUL (2)

Calculer l'activité de la G-6-PDH en utilisant les formules suivantes :

$$\text{Sérum : UI/L} = (\Delta\text{Abs/min}) \times 492$$

Erythrocytes :

$$\text{UI/L de sang} = (\Delta\text{Abs/min}) \times 50\,000$$

Résultats en unités par gramme d'Hémoglobine

$$\text{UI/g d'Hb} = \frac{(\Delta\text{Abs/min} \times 5\,000)}{\text{Hb exprimée en g/dL}}$$

Exemple : Si Δ Abs/min = 0,030 et Hb = 14.5 g/dL

$$\text{UI/g d'Hb} = \frac{0,030 \times 5000}{14,5} = 10,3$$

Résultats en unités pour 10¹² Erythrocytes (# Résultat en UI/g d'Hb x 29)

$$\text{UI/10}^{12} \text{ Erythrocytes} = \frac{(\Delta \text{ Abs/min} \times 50\,000)}{\text{Nombre d'érythrocytes en } 10^{12} / \text{Litre}}$$

Exemple : si Δ Abs/min = 0,030 et nombre d'érythrocytes = 4,2 . 10¹²/L

$$\text{UI/10}^{12} \text{ Erythrocytes} = \frac{0,030 \times 50\,000}{4,2} = 357$$

Résultats en unités par mL d'Erythrocytes (# Résultats UI/g Hb x 0,34)

$$\text{UI/mL d'Erythrocytes} = \frac{(\Delta\text{Abs/min} \times 5\,000)}{\text{Hématocrite (\%)}}$$

REFERENCES

- (1) TIETZ N.W. *Textbook of clinical chemistry*, 3rd Ed. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, W.B. Saunders (1999) p. 1645-1650.
- (2) *Clinical Guide to Laboratory Test*, 4th Ed., N.W. TIETZ (2006) p. 458-457.
- (3) YOUNG D.S., *Effect of Drugs on Clinical laboratory Tests*, 4th Ed. (1995) p. 3-294
- (4) BEUTLER et Al., *International committee for standardisation in Haematology : « Recommended Methods for Red Cell Enzyme Analysis » British Journal of Haematology*, (1977), 35, p.331-340.
- (5) BEUTLER E., *Red cell metabolism, : A manual of biochemical methods* (3rd Ed.) Orlando, Grune et Stratton (1984), p.68-70

Thème: recherche du variant africain A- du déficit en glucose 6 phosphate déshydrogénase par PCR-RFLP

Résumé:

Le glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est une enzyme principale de la voie de pentose qui protège les globules rouges au stress oxydatif, Le déficit en G6PD est une maladie héréditaire lié au chromosome X. Elle affecte environ 420 millions de personnes dans le monde et présent sous plusieurs variants dont la variant africain A- est le plus fréquent. Le dosage de l'activité enzymatique G6PD chez les cas étudiés (4 patients) a confirmé le déficit et qui font partie de la classe III selon la classification de L'OMS. D'après les résultats des études antérieures nous avons constaté que la forme africaine, en Algérie, Tunisie, Mauritanie et au Portugal, présentent une fréquence aux alentours de 46%, par contre elle est moins fréquente en Colombie 15.23%, Arabie saoudite 2 % et en Irak 1.64%.

Mots clés : Déficit en G6PD, G6PD A-

Abstract:

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is a major enzyme in the pentose pathway that protects red blood cells from oxidative stress. It affects around 420 million people worldwide and has several variants, of which the African A- variant is the most common. The assay of G6PD enzyme activity in the cases studied (4 patients) confirmed the deficiency and they are in class III according to the WHO classification. According to the results of previous studies we found that the African form, in Algeria, Tunisia, Mauritania and Portugal, present a frequency around 46%, but it is less frequent in Colombia 15.23%, Saudi Arabia 2% and Iraq 1.64%.

Key words: G6PD deficiency, G6PD A-

المخلص:

إنزيم نازعة هيدروجين الجلوكوز 6 فوسفات (G6PD) هو إنزيم رئيسي في مسار البنتوز يحمي خلايا الدم الحمراء من الإجهاد التأكسدي، ونقصه مرض وراثي مرتبط بالكروموسوم X. يصيب حوالي 420 مليون شخص في العالم وله عدة متغيرات، من بينها المتغير الأفريقي وهو الأكثر شيوعا. أكد قياس نشاط إنزيم G6PD نقصه في الحالات المدروسة (4 مرضى)، حيث تم تصنيفهم في الفئة الثالثة وفقا لتصنيف منظمة الصحة العالمية. من نتائج الدراسات السابقة وجدنا أن المتغير الأفريقي في الجزائر، تونس، موريتانيا و البرتغال يمثل نسبا تقارب 46%، تقابلها نسبا أقل في كولومبيا 15.23%، المملكة العربية السعودية 2% والعراق 1.64%.

الكلمات الرئيسية: نقص G6PD، G6PD A-