

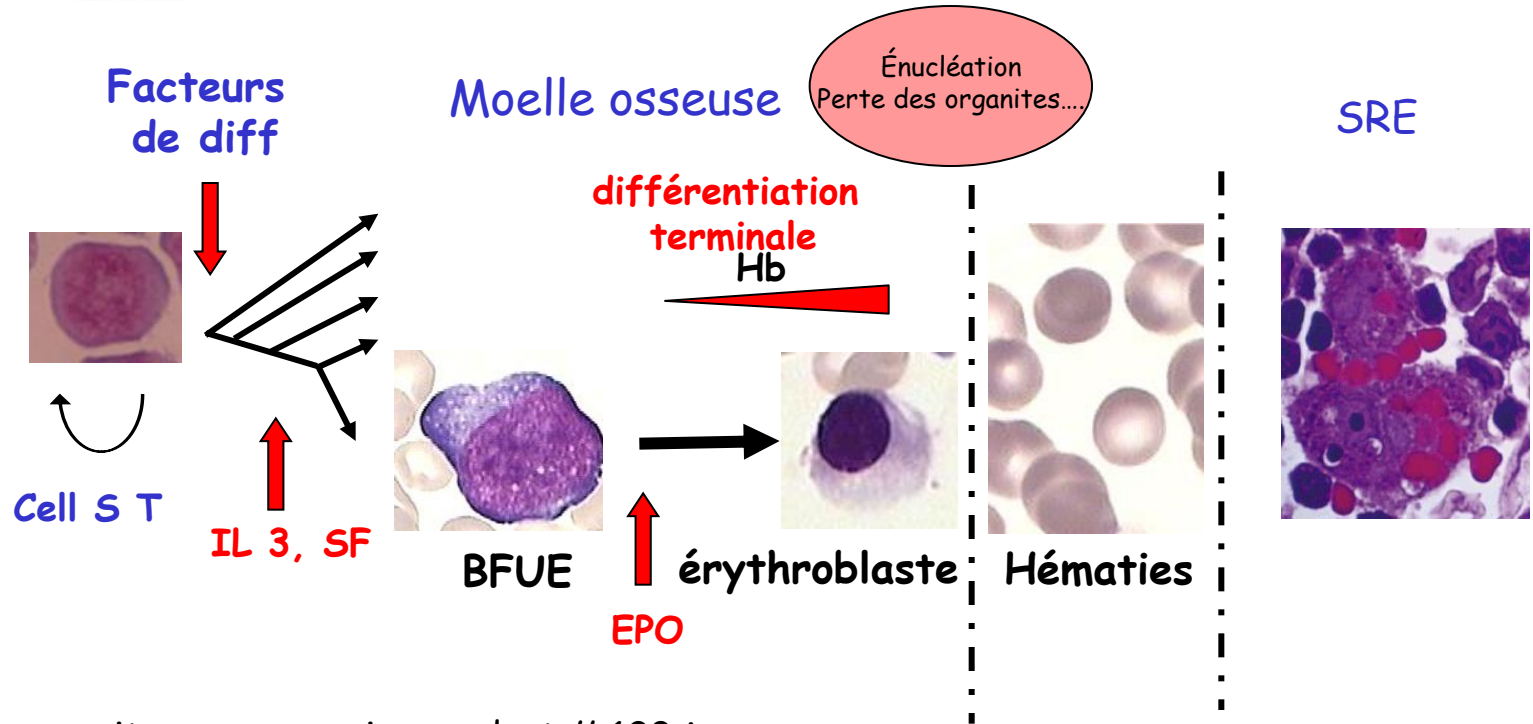
Les déficits en enzymes érythrocytaires à révélation précoce : diagnostic biochimique et moléculaire.



Dr. Serge Pissard

Laboratoire de Biochimie et Génétique
Hop. Henri Mondor, Créteil France
Université Paris Est Créteil
Inserm U 955 eq 11

Différenciation du globule rouge

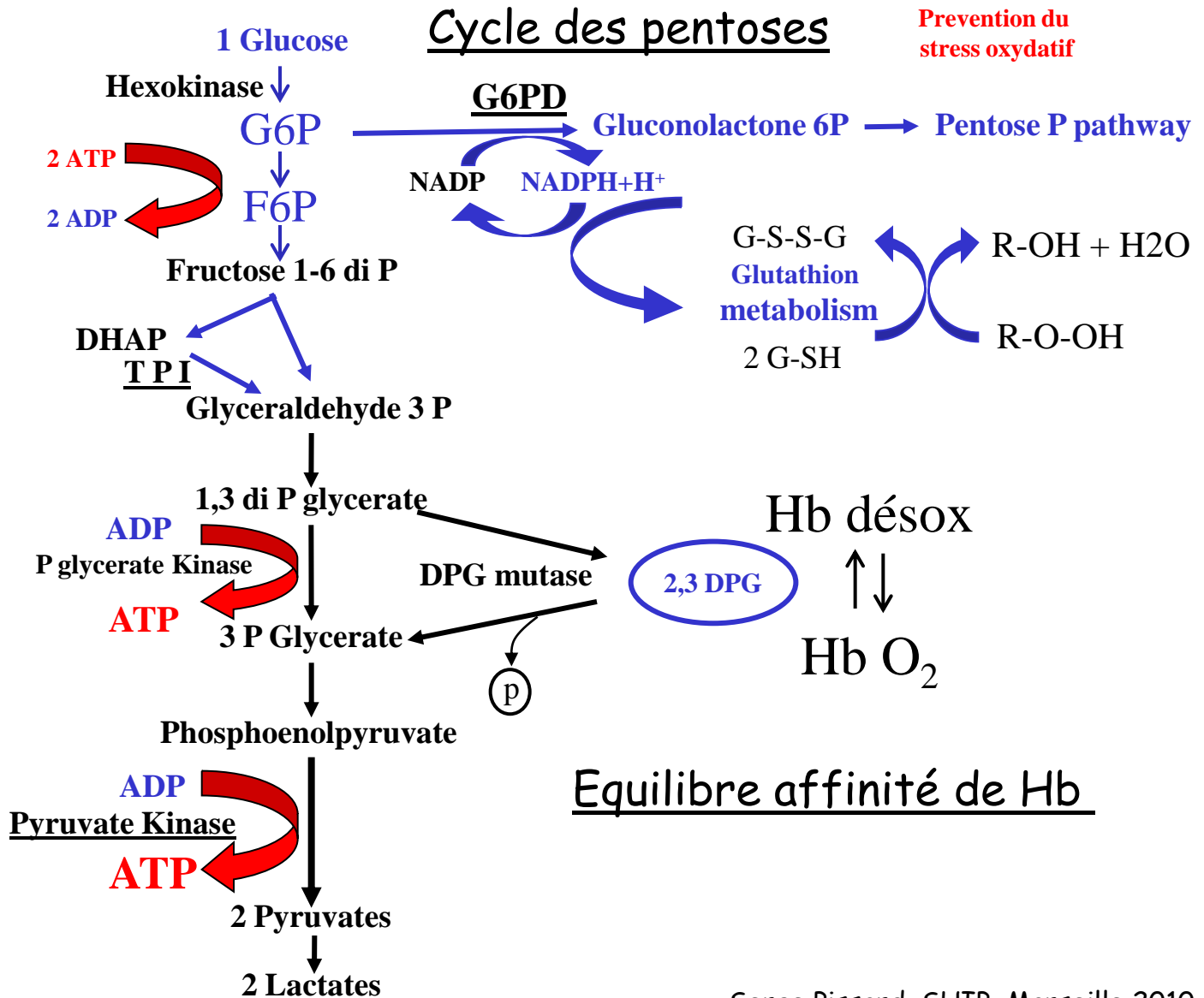


- Le globule rouge vit sur son acquis...pendant # 120 jours

- il est dépendant de la glycolyse anaérobie pour ses principales fonctions :

- Fourniture énergétique : pyruvate kinase
- Protection contre les oxydations : G6PD
- régulation de la fonction oxyphorique

Glycolyse anaérobie dans le globule rouge



Enzymopathie du globules rouge

Fréquence des déficits

Mode de transmission

Mode de révélation

Cycle pentose

G6PD > 400 Millions porteurs
Afrique, Maghreb, Asie

Récessif lié à l'X

Lié au stress oxydatif
(médicaments, alimentaire)

Glycolyse

Pyr Kin : > 600 cas décrit
Pop Caucasienne

Récessif Chro 1

Anémie chro
« dose dépendant »

P Gluc. isom: > 300 cas

Récessif Chro 19

hémolyse

P glycerate Kin < 100 cas

Récessif lié à X

Hemolyse + neuro musculaire

P Fruct. Kin. < 100 cas

Récessif Chro 1

Hemolyse + musculaire

TPI < 50 cas

Récessif Chro 12

Hemolyse + neuro

Hexokinase < 25 cas

Récessif Chro 10

hémolyse

L'implication d'un déficit enzymatique dans une hémolyse du nourrisson est à discuter en fct

- de l'origine ethnique
- du mode de révélation
- influence de la mixité

Déficit en G6PD

C'est le plus fréquent des déficits enzymatiques...

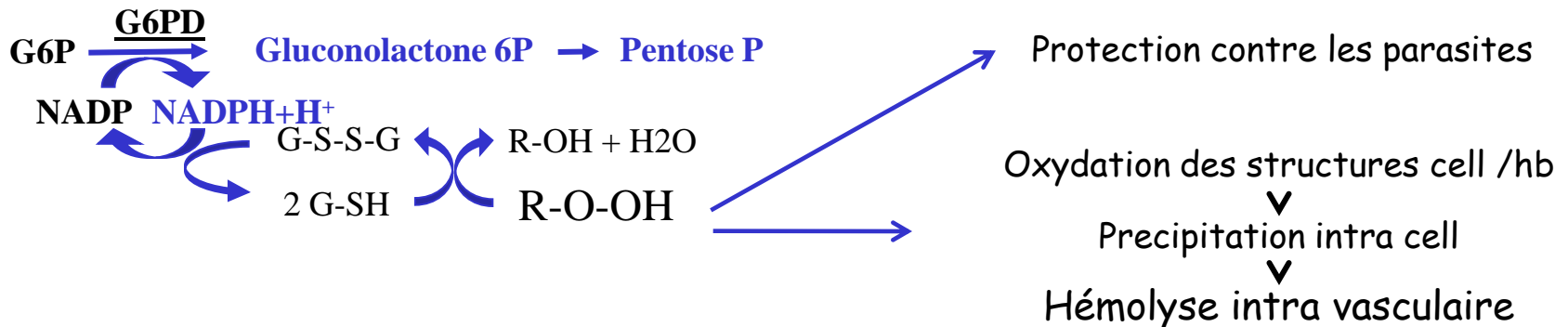
la diffusion du déficit ayant été assuré grâce à Plasmodium Falciparum

- 400 000 millions de porteurs sur la planète... Afrique, Maghreb, Asie
- de 250 000 à 400 000 en France (distribution « inhomogène »)

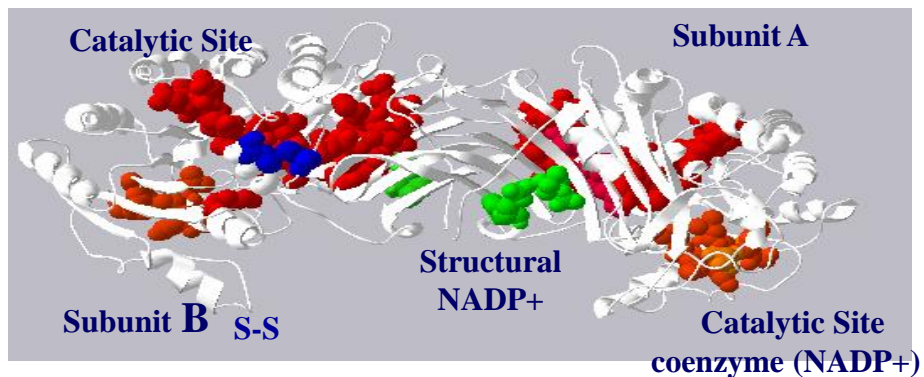
- Transmission liée à X :

	♂ porteur	♀ hez	♀ hoz
Est ...	« malade »	normale	« malade »
dosage	déficitaire	Variable (lyonisation)	déficitaire
transmet à	toutes ses filles	1/2 de ses fils 1/2 de ses filles	tous ses fils toutes ses filles

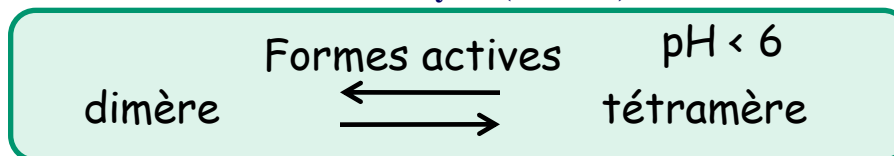
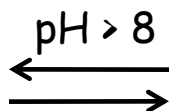
- Mécanisme physiopathologique :



Relations structure /déficit



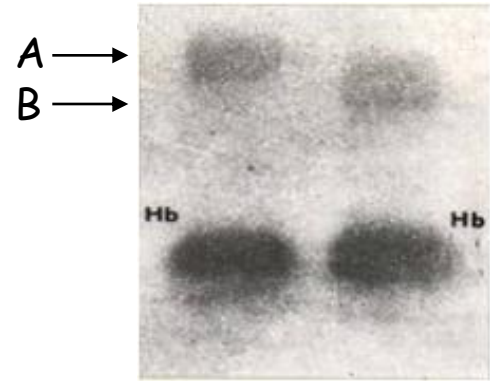
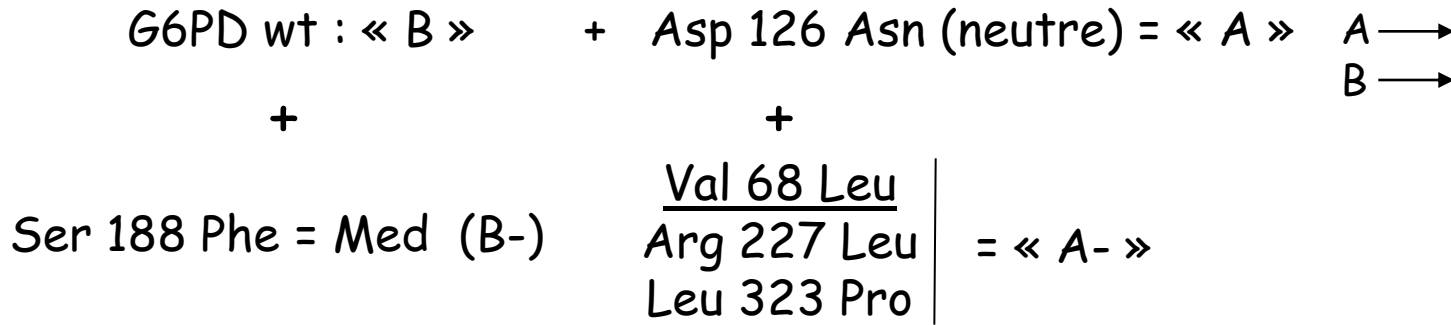
Monomère (515 aa)
inactif



Quelques % de l'activité sont suffisant pour assurer la protection anti OX de « base »

Classe	Activité enzymatique	Manifestations cliniques	variants les plus fréquents	Nbr de variants décrits
Classe I	Presque zéro	Anémie hémolytique chronique	Sporadique; très rare prévalence 1/1000 000	60 (interface de dimère et le site de NADP+ structurel)
Classe II	<10%	Hémolyse aiguë (favisme)	Méditerranéenne (Ser188Phe c.563C>T) Canton 459 Arg>Leu (1.7% des hommes en SEA)	
Classe III	10-60%	Hémolyse aiguë	A- (202G → A associée à 376A → G) 20% chez les Africains 3% d'homozygotie chez les femmes en Côte-d'Ivoire et 5% au Congo	Protéine instable
Classe IV	Normal			

Les principales formes et leur répartition géographique



-Distribution géographique caractéristique : « ceinture intertropicale »

« A- » - Afrique noire : 20 % de la population porteuse d'un déficit modérée III

« B- /med » - Pourtour méditerranéen : présence d'un déficit intermédiaire (II)
 « favisme »

-Manifestation liée à un stress oxydatif... médicament...alimentation
 (sauf pour les déficits complet (classe I))

En europe du nord, répartition très inhomogène : foyer de def « A- » +++

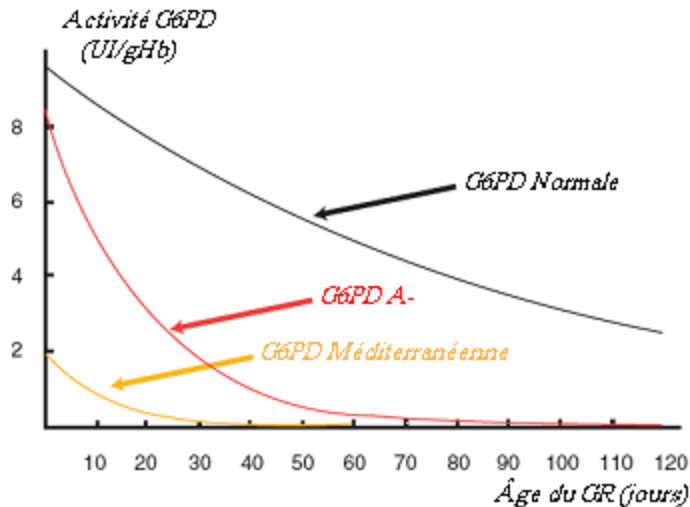
Pb du diagnostic enzymatique

Dosage facile...mais pb de référentiel

- Lié à la transmission du def

♂ hémizygote ♀ Hétérozygote + « Lyonisation »

- Lié à la cinétique de diminution de l'activité enzymatique (vieillessement plvt)



Diminution de la demi-vie de la protéine

Normale :	62 jours
A ⁻ :	13 jours
Med :	8 jours

- En poste crise, disparition des globules déficitaires, dosage « nal ».

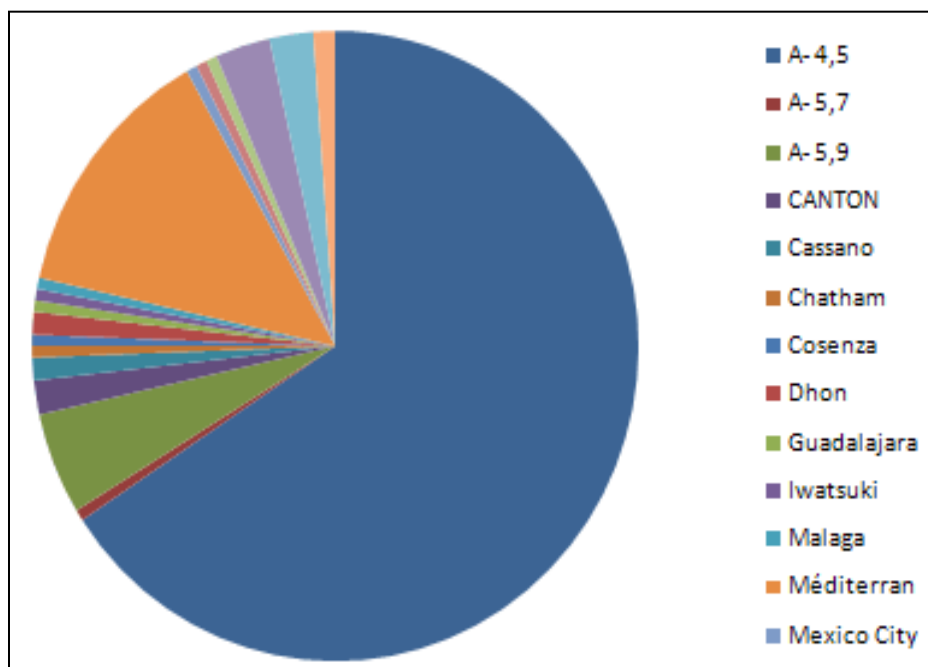
Circonstance du diagnostic en néonatal

Ictère néonatal survenant chez un garçon (fille) appartenant a un groupe à risque (Afrique, maghreb, asie) soumis a un stress oxydatif (médicament, infection)

Le diagnostic biochimique repose sur le dosage de l'activité chez les parents (mères +++) et le père aussi

Le diagnostic de certitude peut être fait par l analyse du gène

PCR + RFLP (forme A - et « med ») ou séquence du gène (exon 10 et 11 +++)



Diagnostic moléculaire à
H. Mondor
193 cas :
60% A-
22 % de B- (med)
3 de classe I

Mutants G6PD rares trouvés à Créteil

Santamaria	542 A→T	11713T	181 Asp→Val	6	II
	376 A→G	10877G	126 Asn→Asp		
Mexico City	680 G→A	12028A	227 Arg→Gln	7	III
Seattle	844 G→C	12557C	282 Asp→His	8	III
Iwatsuki	1081G→A	13380A	361Ala→Thr	10	I
Guadalajara	1159 C→T	13458T	387 Arg→Cys	10	I
Puerto Limon	1192 G→A	13491A	398 Glu→Lys	10	I
Cassano	1347 G→C	13750C	449 Gln→His	11	II
Cosenza	1376 G→C	13884C	459 Arg→Pro	12	II
Dhon (Kaiping)	1388 G→A	13896A	463 Arg→His	12	II
	Δ1000-1002		ΔThr334	9	I
	496 C→T		166 Arg→Ser	6	II

Déficit en PK en période néonatale

bonne tolérance chez l'adulte



- souvent découverte fortuite chez un couple
- maladie dont la fréquence est sous estimée

La sévérité clinique est très variable : ictère néonatal \longrightarrow décès périnatal
associé à une anémie normocytaire, le plus svf régénérative

Impossibilité de faire un dosage fiable chez l'enfant du fait de l'instabilité de l'érythropoïèse

Le diagnostic se fait par la mesure de l'activité enzymatique chez les parents

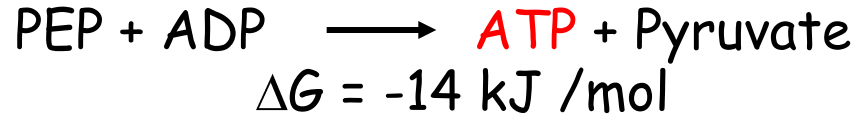
Toujours plusieurs activités dosées conjointement Pk + HK (+ G6PD) (réticulocytose)

Diagnostic moléculaire pour :

- proposer diagnostic prénatal dans les cas de mutation sévères (hydrops foetalis)
- préparer une naissance « sécurisée » (transfusion intra utérine)
- faire un diagnostic de certitude dans une famille

Structure de l'enzyme:

enzyme clef du métabolisme énergétique du GR

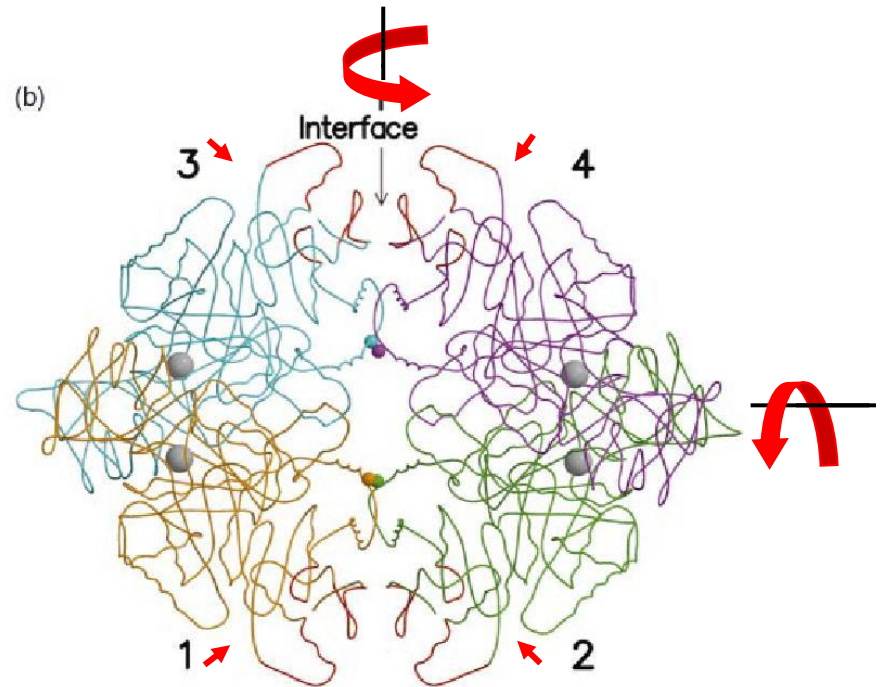
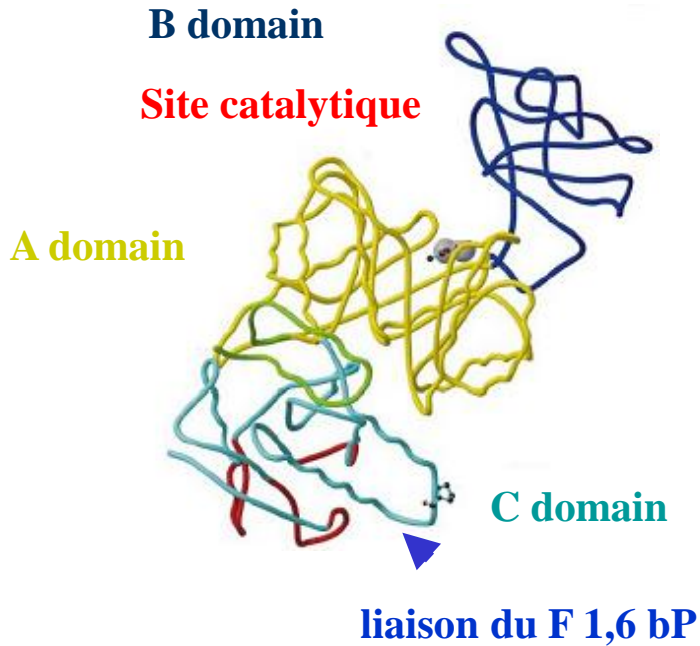


étape irréversible, régulation de type allostérique (F1.6 bP, PEP....)

Produit du gène : monomère



Enzyme active : tétramère
« double dyad » symétrie



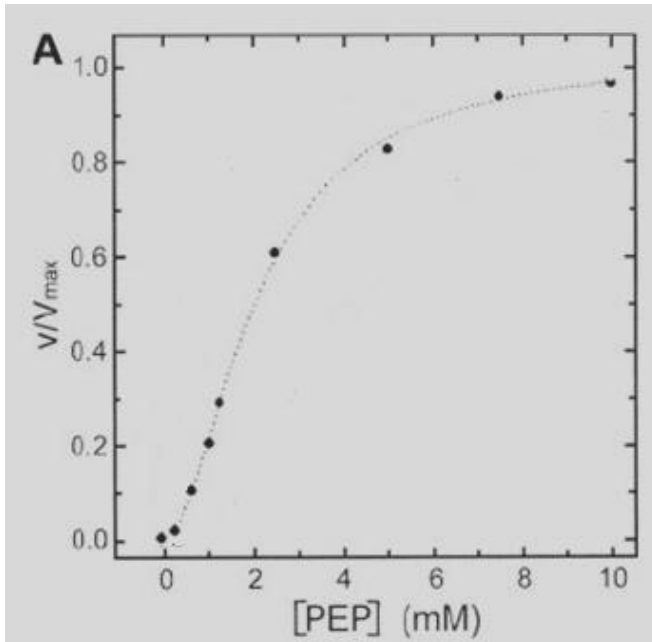
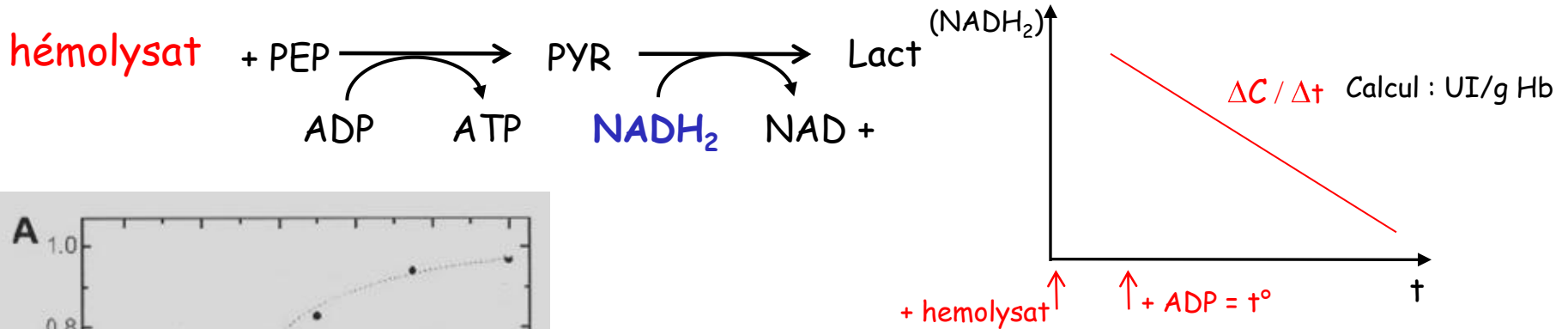
Dosage de l'activité au laboratoire

- L'activité dosée est le moyennage de cellules jeunes et de cellules sénescents

- nécessité de préserver au mieux les cellules → prélèvement sur ACD (EDTA)

- normalisation de « l'âge moyen » grâce à une autre activité Enz : G6PD (chro X)
Hexokinase (chro 10)

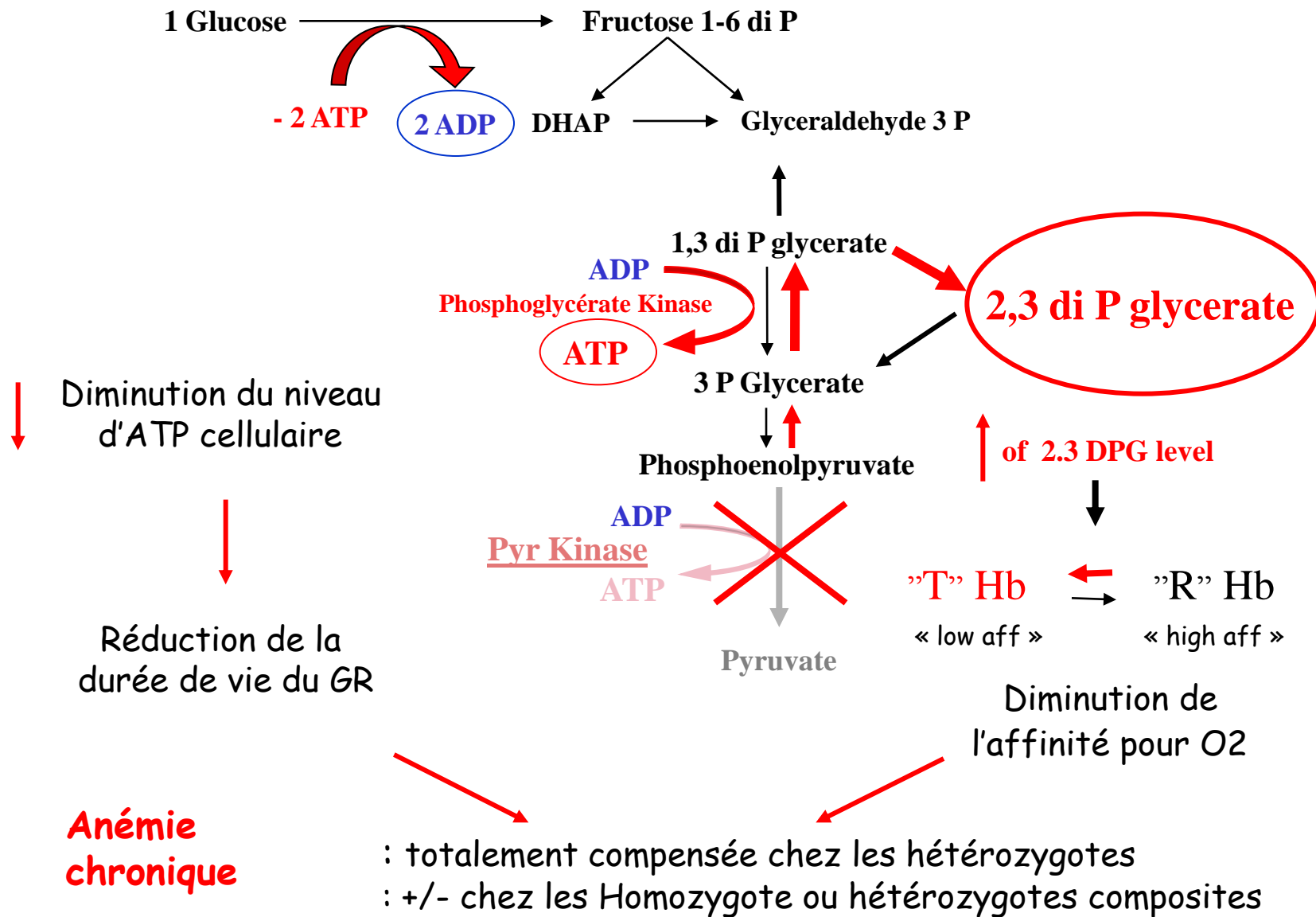
- Mode de détermination de l'activité enzymatique



La concentration en substrat (PEP, ADP) utilisée est « saturante »

→ pas de prise en compte de l'allostérie

Déficit en Pyruvate Kinase : maladie du (très) jeune enfant ? conséquences métaboliques ... chez l'adulte



Déficit en pyruvate Kinase : Conséquence métabolique... à la naissance

les mêmes mais...

"d'un métabolisme aquatique à un métabolisme aérien..."

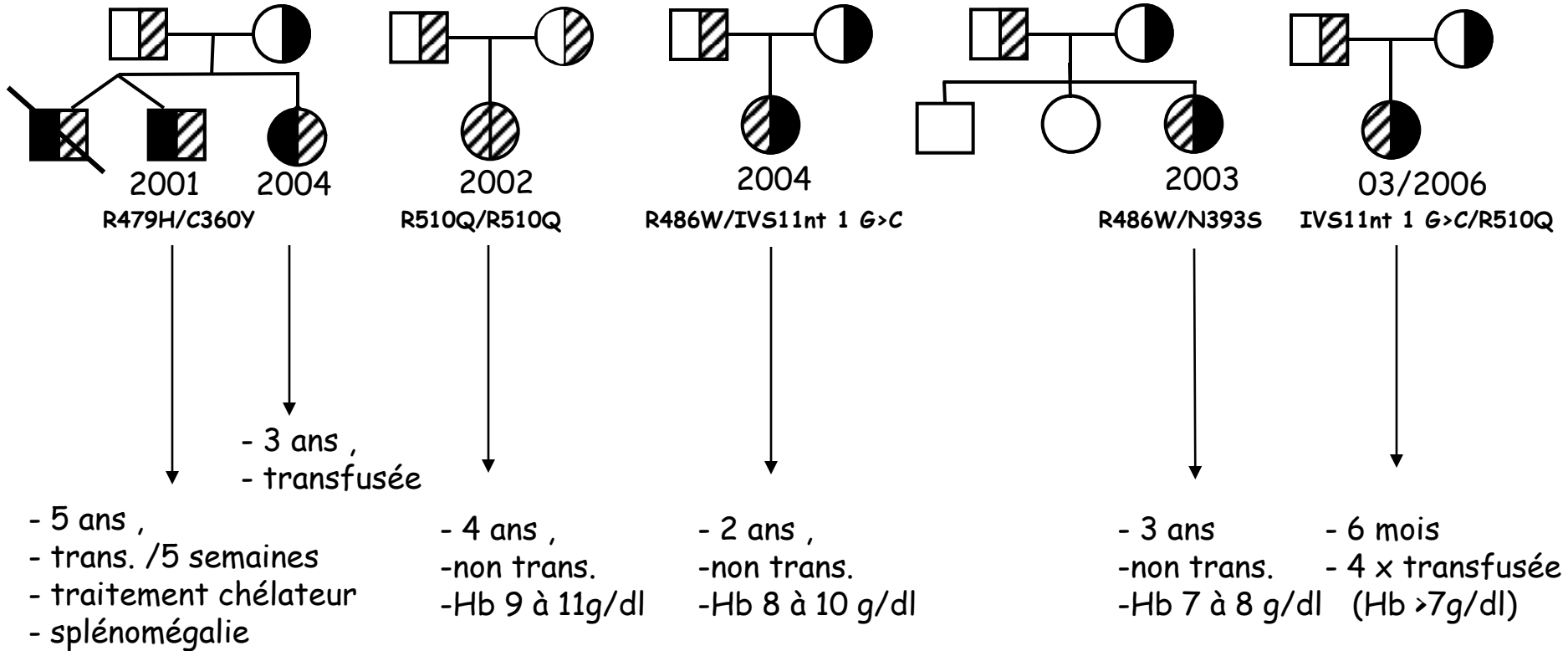
stress hématologique
Périnatal

- « The globin switch » : gènes γ (insensible au 2.3 DPG) vers gène β
Hb F : hb à haute affinité incapable de compenser l'anémie
- « drop » dans le niveau d'EPO : Δ du lieu de synthèse (foie vers rein)
et \nearrow pO_2) : Phase « hypoplastique » transitoire »
- Augmentation de l'activité...

PK value (UI/g Hb)	3.4	2.9	3.8	3.6	4.6	3.4	4.6	5.7
PK / G6PD	0.54	0.53	0.75	0.76	0.75	0.5	0.65	0.9
PK genotype	C360Y/N	N/R479H	R510Q/N	N/R510Q	R486W/N	N/IVS 11 nt 1 G>C	N393S/N	N/R486W
	Hb : 3.4 g /dl HSM Transfusion	Hb : 6 g /dl Ictère néonatal, HSM	Hb : 9.2 g /dl Ictère néonatal	Hb : 6.5 to 9.2 g /dl Ictère néonatale transfusion				
	Diagnostic à l'age 12 mois R479H/C360Y	Diagnostic à l'age de 17 mois R510Q/R510Q	Diagnostic à l'age de 4 mois R486W/IVS 11 nt 1 G>C	Diagnostic à l'age de 6 mois R486W/N393S				

Le déficit en Pyruvate kinase est une maladie « périnatale » sévère

Devenir des nouveau nés atteints.....



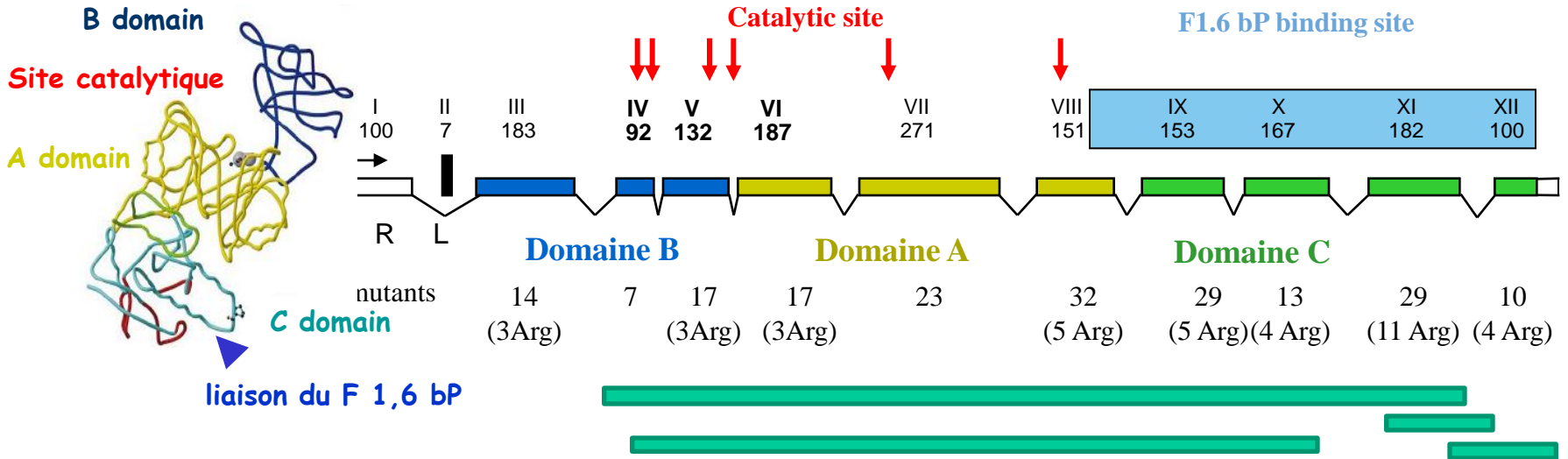
« thalassémie majeure »

« thalassémie intermédiaire...en amélioration »

trop jeune

Biologie moléculaire du déficit en Pyruvate Kinase

Gène *PKLR* : 1q21, 1725 nt de séquence codante, protéine PK-R : 574 aa

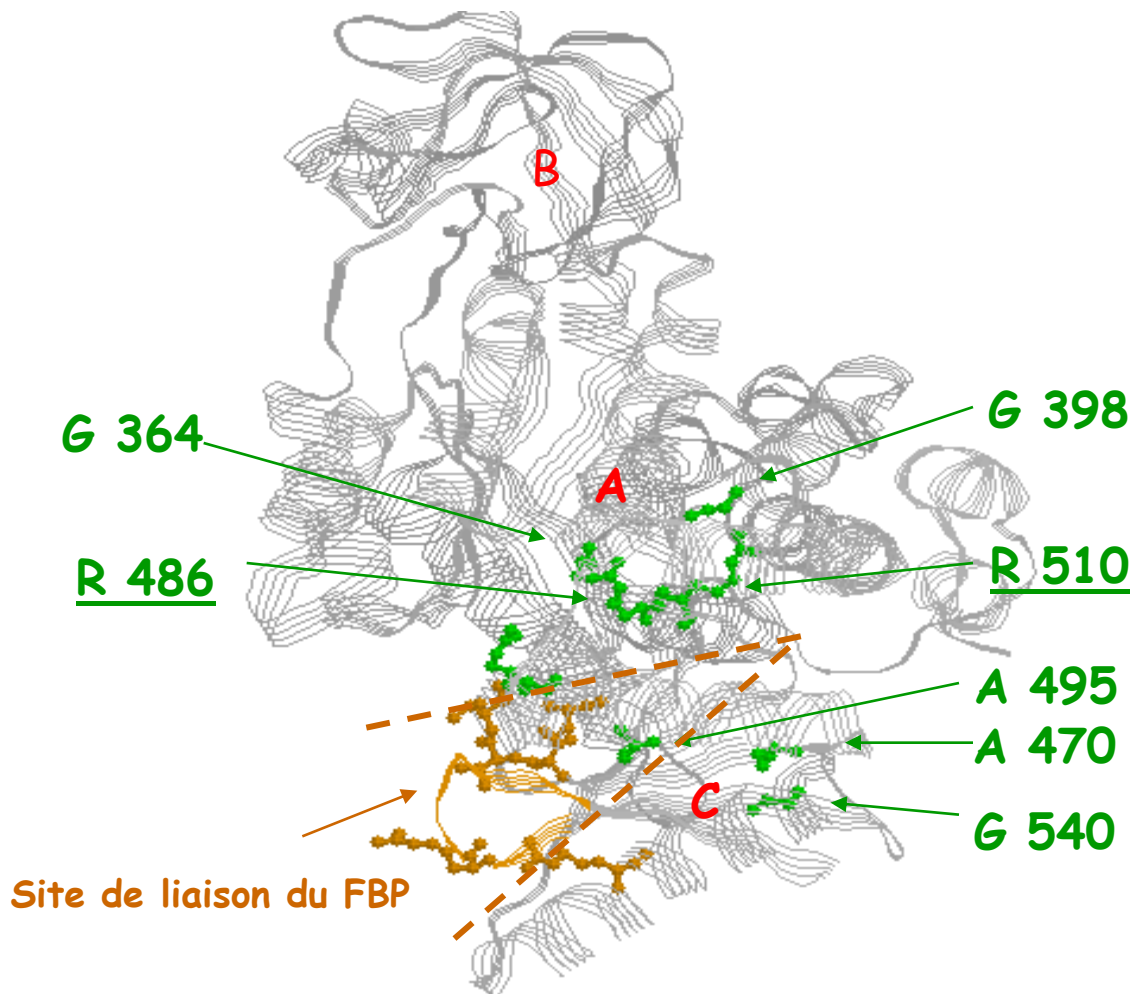


3 mutations fréquentes : E241X (ex 7) et Arg510Gln, Arg486Trp (ex 11)

Le diagnostic est fait par une analyse complète du gène par « séquençage universel » + recherche de délétion par QMPSF / MLPA.

Très grande fréquence des mutations « privées »...

Site de liaison du F 1,6 BP : interface A/C interface et exon 12

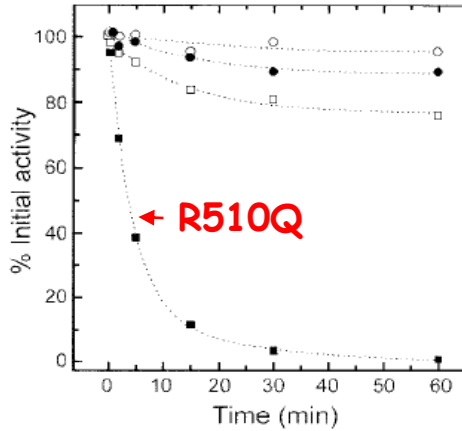
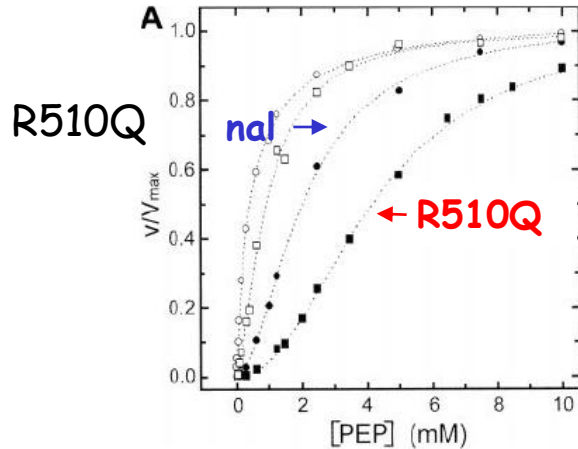


Mutations	activité Pk chez les hez (nal 5.9-8.1 UI/g Hb)
G364D	3.7-3.1
G398A	3.6
A470D	2.3
R486W	3.4 / 4.8
R486L	3.4
A495V	3.2
R510Q	3 / 5.1
G540R	3.6
R559G	3.6
R569M/L	3.2

Analyse in vitro de l'effet des mutations : 2 exemples

Vmax / substrat

thermostabilité

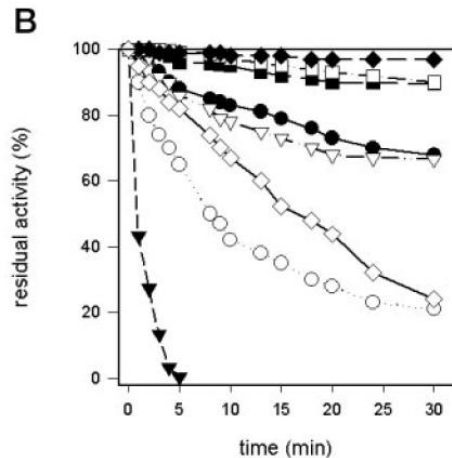
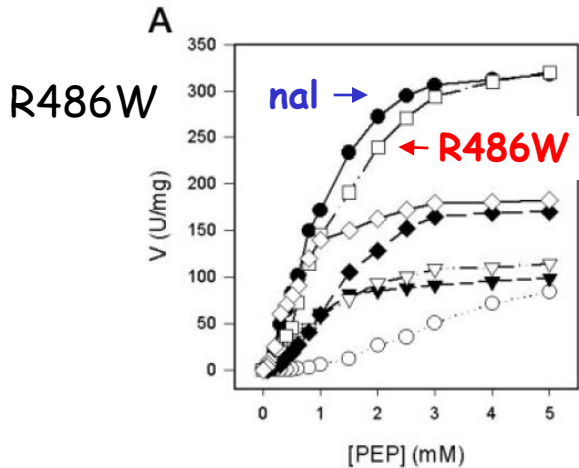


← nal

R510Q induit une déstabilisation de l'enzyme

blood, 2001, 98, p 3113-20

R486W n'altère pas « in vitro » les caractéristiques de bases de l'enzyme



← R486W

← nal

Fréquente

16 / 54 familles

Acti. Pk

R486W 3.4 / 4.8

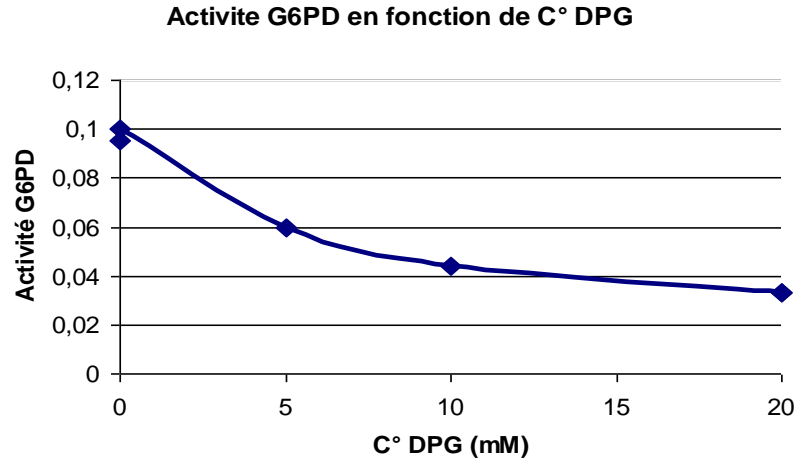
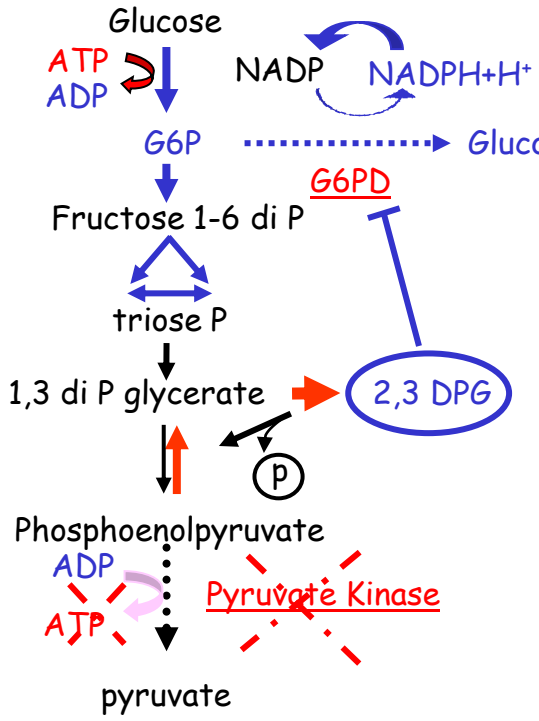
R486L 3.4

JBC, 2002, 277, p 23807-14

Association d'anomalies

Relation entre déficit en Pk et déficit en G6PD

Les fréquences des deux déficits + mixité de la population rend possible l'association des deux



Le 2,3 DPG a un effet inhibiteur sur la fonction de la G6PD

Patiente double hétérozygote PK / G6PD

Femme, originaire d'Afrique : Hb 10g/dL, VGM 98fL, sans Hb anormale

Étude des enzymes érythrocytaires

Analyse moléculaire

PK : 3.2 (nal : 6 - 8 UI /g Hb)

c.1706 G>T Arg569 Met/Leu (ex 12) Hez

G6P : 4.5 (nal : 5.3-7.9 UI / g Hb)

c.542 A>T Asp181Val (ex6) G6PD «Santamaria » Hez
+ Asn126Asp

2.3 DPG : 21.2 (nal : 14 +/- 1 m mol /g
Hb)

Association d'un deficit en Pk partiel

+

Deficit G6PD hez (classe II)

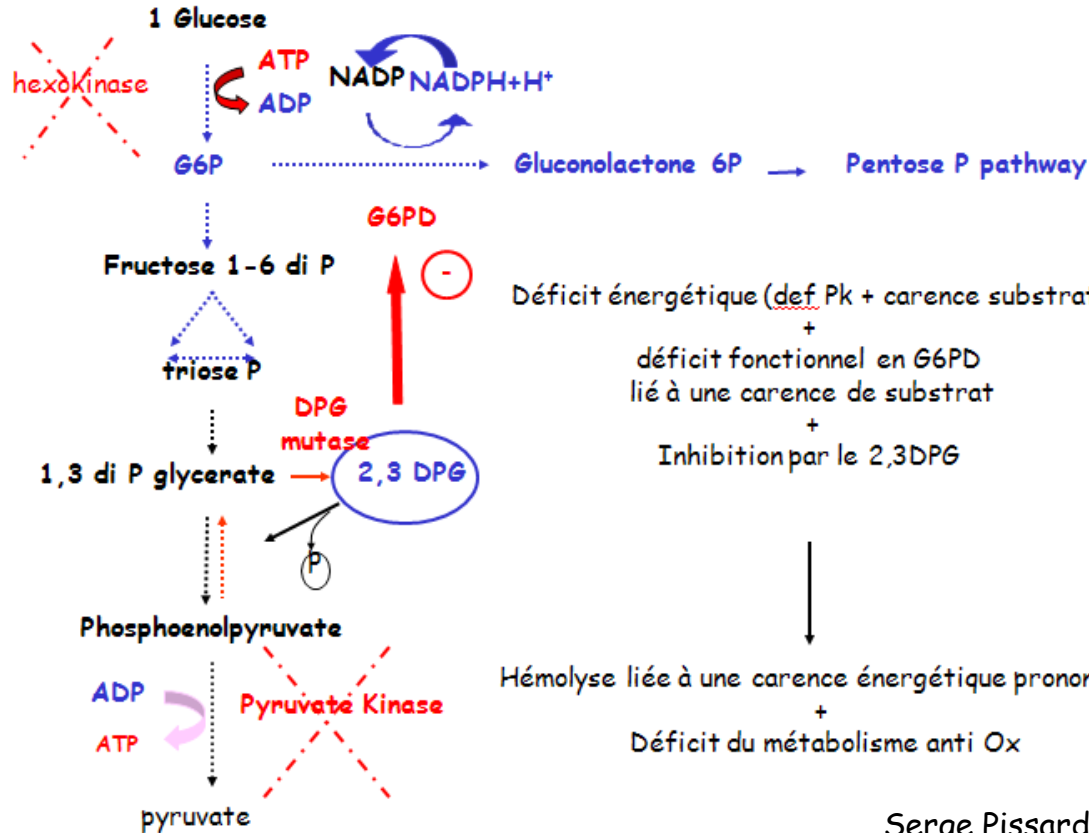
+

Inhibition fonctionnelle G6Pd par le 2,3 DPG

Association def PK + déficit en hexokinase

Premier enfant d'un couple caucasien asymptomatique, anémie hémolytique d'apparition périnatale marquée (Hb 7g/dl), réticulocytose franche.

PK	: 7	(nal : 6 - 8 UI /g Hb)	—————>	IVS 4 + 10 G>T Hez
G6PD	: 9.2	(nal : 5.3-7.9 UI / g Hb)		
HK	: 0.55	(nal : 0.74 - 1.14 U/g Hb)	—————>	c.1836_c.1836 del [50] (exo 12/int 12) Hez



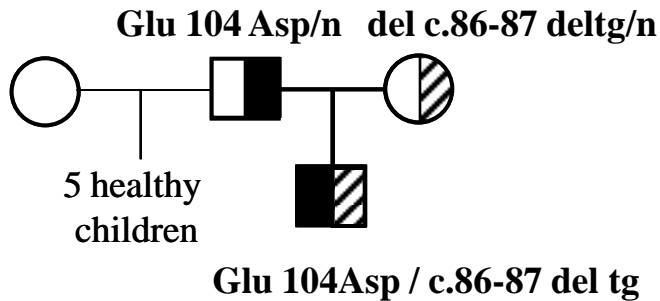
Deficit en TPI

- Transmission recessive, maladie rare (34 cas décrit)

- érythropièse: hémolyse chronique +/- macrocytose
- + trouble neuromusculaire d'apparition progressives
- + mental retardation
- + tendance aux infections

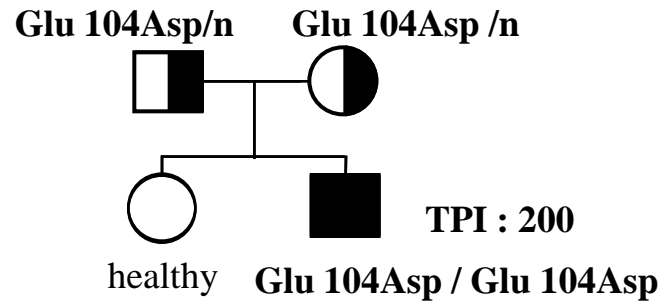
Décès avant 5 ans

TPI acti : 510 515
nal 1000 to 1600 UI /g Hb



- prématurité
- Anémie néonatale (7 g /dl)
- ictere
- encéphalopathie
- infection
- deces au 4 jours

TPI acti : 530 650
nal 1000 to 1600 UI /g Hb



- Anémie neonatale (4 g /dl)
- Dysfonction neuromusculaire a l'age of 1 year
- Retard mental

Merci....

Comite d'organisation de la SHIP

Laboratoire du Globule rouge (phénotype et génotype)

Henri Wajcman et Kamran MORADKHANI

