

Université de Sherbrooke

L'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire  
par déficience en pyruvate kinase (PK)

par

André Larochelle

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.)

Septembre 1992

© Droits réservés d'André Larochelle 1992



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services Branch

Direction des acquisitions et  
des services bibliographiques

395 Wellington Street  
Ottawa, Ontario  
K1A 0N4

395, rue Wellington  
Ottawa (Ontario)  
K1A 0N4

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

**The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.**

**L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.**

**The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

ISBN 0-315-81886-7

**Canada**

A mes parents,

,

Quand la Nature t'instruit,  
Ton âme s'épanouit.

Goethe

# TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES .....	iii
LISTE DES FIGURES .....	viii
LISTE DES TABLEAUX .....	xi
LISTE DES ABREVIATIONS .....	xii
SOMMAIRE .....	xv

## INTRODUCTION

1. L'érythrocyte mature .....	1
1.1 Le système de transport de l'oxygène .....	2
1.2 Le système responsable des échanges extracellulaires et de la forme érythrocytaire .....	2
1.3 Les systèmes de génération d'énergie, de réparation des dommages oxydatifs et du métabolisme des nucléotides .....	3
2. Les anémies hémolytiques congénitales .....	6
2.1 Pathogénie et classification .....	6
2.2 Manifestations cliniques .....	7
2.3 Signes biologiques .....	10
2.3.1 Manifestations en rapport avec l'hyperhémolyse .....	10
2.3.2 Manifestations en rapport avec l'érythropoïèse accélérée ..	12
3. Le déficit en pyruvate kinase (PK) .....	13
3.1 La pyruvate kinase .....	13
3.1.1 Caractérisation de la protéine .....	13
3.1.2 Caractérisation génétique .....	16
3.2 Fréquence et répartition géographique du déficit en PK-R .....	18
3.3 Génétique .....	20
3.4 Physiopathologie .....	21
3.5 Manifestations cliniques .....	21
3.6 Données biologiques .....	22
3.7 Diagnostic .....	22
3.8 Traitement .....	24
4. Intérêts et objectifs du projet de recherche .....	24

## MATERIEL ET METHODES

1. Sujets étudiés .....	27
1.1 Classification .....	27
1.2 Données cliniques .....	27
2. Préparation d'une banque de plasma-lymphocytes-érythrocytes .....	32
2.1 Matériel à préparer .....	32
2.2 Isolement du plasma .....	32
2.3 Isolement des lymphocytes .....	33
2.4 Isolement des érythrocytes .....	34
3. Isolement des acides nucléiques .....	35
3.1 Extraction d'ADN génomique à partir des lymphocytes .....	35
3.2 Extraction d'ARN total .....	36
3.2.1 A partir de tissus .....	36
3.2.2 A partir de lymphocytes .....	37
3.3 Extraction d'ARNm à partir de lymphocytes .....	38
4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....	39
4.1 Amorces .....	41
4.1.1 Sélection .....	41
4.1.2 Purification .....	42
4.2 PCR standard .....	46
4.2.1 Mélange réactionnel .....	46
4.2.2 Automatisation .....	47
4.2.3 Analyse des résultats et isolement des fragments produits par PCR .....	49
4.3 PCR asymétrique .....	51
4.4 RT-PCR .....	53
4.4.1 Transcription inverse .....	53
4.4.2 Amplification par PCR .....	55
5. Clonage .....	56
5.1 Préparation du vecteur de clonage .....	56
5.2 Ligation .....	59

5.2.1 Ligation d'ADN isolé par interception sur DEAE-cellulose .....	59
5.2.2 Ligation d'ADN conservé dans l'agarose à faible point de fusion .....	60
5.3 Préparation des cellules compétentes et transformation .....	60
5.3.1 Matériel .....	61
5.3.2 Préparation des cellules compétentes .....	63
5.3.3 Transformation .....	63
5.4 Sélection et amplification des clones recombinants .....	64
5.4.1 Micropréparation d'ADN .....	65
5.4.2 Minipréparation d'ADN par lyse alcaline .....	65
5.4.3 Grosse préparation d'ADN par lyse alcaline .....	66
5.5 Conservation des clones .....	67
6. Séquençage .....	67
6.1 Séquençage des fragments d'ADN clonés dans pBluescript .....	67
6.2 Séquençage direct .....	68
6.3 Analyse des séquences .....	69
7. Analyse par "Southern blots" .....	69
7.1 Préparation des échantillons et migration électrophorétique .....	70
7.2 Transfert de l'ADN sur filtre de nylon .....	70
7.3 Génération des sondes .....	71
7.3.1 Préparation des matrices pour le marquage .....	71
7.3.2 Marquage .....	71
7.3.3 Purification des sondes .....	72
7.3.4 Détermination du pourcentage d'incorporation .....	72
7.4 Préhybridation et hybridation .....	73
7.5 Désybridation .....	74
8. Analyse par "Northern blots" .....	74
8.1 Linéarisation de l'ARN total et électrophorèse .....	74
8.2 Transfert des ARN sur filtre de nylon .....	74
8.3 Préhybridation et hybridation .....	75

## RESULTATS

1. Optimisation des conditions expérimentales .....	76
1.1 Spécificité et rendement du PCR .....	77
1.1.1 PCR et contamination .....	77
1.1.2 Effet des variations de concentrations en MgCl <sub>2</sub> .....	77
1.1.3 Spécificité, rendement et purification des amorces .....	79
1.1.4 Impact du choix des températures d'hybridation (T <sub>h</sub> ) .....	79
1.1.5 Rôle du départ à température élevée ("hot start") .....	82
1.1.6 Impact des variations de concentrations en ADN .....	82
1.1.7 Effet du choix commercial de l'ADN polymérase thermostable .....	84
1.2 PCR asymétrique .....	86
1.2.1 Effet des variations du rapport des concentrations des amorces utilisées .....	86
1.2.2 Génération d'ADN monocaténaire sens versus antisens ...	89
1.3 RT-PCR .....	89
1.4 PCR et séquençage .....	94
1.4.1 Influence de la nature double brin ou simple brin et de la qualité de l'ADN .....	94
1.4.2 Effet du choix de l'ADN polymérase et de la configuration des mélanges nucléotidiques- Rôle du DMSO .....	96
1.4.3 Effet de l'orientation sens ou antisens de la matrice d'ADN .....	98
2. Etude du gène PK-L et de la déficience en PK-R .....	100
2.1 Recherche d'anomalies génétiques responsables de la déficience en PK-R .....	100
2.1.1 Absence de mutations dans les régions codantes et introniques étudiées .....	100
2.1.2 Mutations et artéfacts .....	103
2.2 Identification de variants PK-R non pathologiques .....	103
2.3 Séquences nucléotidiques des introns 1, 3, 5 et 8 du gène PK-L ...	106
2.4 Séquence nucléotidique du promoteur PK-L .....	110
3. Identification de marqueurs génétiques associés à l'anémie hémolytique ..	113
3.1 Caractérisation de produits PCR spécifiquement amplifiés à partir d'ADN lymphocytaire d'individus anémiques .....	113
3.1.1 Etude familiale .....	113

3.1.2 Clonage et séquençage des bandes supplémentaires . . . . .	115
3.1.2.1 Sélection et vérification des clones . . . . .	115
3.1.2.2 Analyse des séquences . . . . .	119
3.2 Etudes génétiques des marqueurs <i>hmf1</i> et <i>hmf2</i> . . . . .	122
3.2.1 Détection des séquences <i>hmf1</i> et <i>hmf2</i> chez des individus normaux et anémiques . . . . .	122
3.2.2 Réarrangement des gènes <i>hmf1</i> et <i>hmf2</i> . . . . .	122
3.2.2.1 Amplification du gène <i>hmf2</i> . . . . .	122
3.2.2.2 Réarrangement du gène <i>hmf1</i> . . . . .	124
3.3 Analyse de l'expression des gènes <i>hmf1</i> et <i>hmf2</i> par "Nor- thern blots" . . . . .	127

## DISCUSSION

1. Etude du gène PK-L et de la déficience en PK-R . . . . .	129
1.1 Mutation de régulation . . . . .	129
1.2 Erreurs versus polymorphismes . . . . .	141
1.3 Promoteur PK-L humain: identification d'éléments régula- teurs . . . . .	143
2. Identification de marqueurs génétiques associés à l'anémie hémolytique . . .	149
2.1 Identification et caractérisation des gènes <i>hmf1</i> et <i>hmf2</i> . . . . .	149
2.2 Rôles physiologiques des gènes <i>hmf 1</i> et <i>hmf2</i> . . . . .	152
2.2.1 Implication au niveau des mécanismes érythropoïétiques . .	152
2.2.2 Implication au niveau des mécanismes de carcinogénèse . .	157
CONCLUSION . . . . .	161
REMERCIEMENTS . . . . .	165
REFERENCES . . . . .	166
APPENDICES . . . . .	181

# LISTE DES FIGURES

---

FIGURE 1. Voies métaboliques des érythrocytes humains. . . . .	4
FIGURE 2. Représentation schématique de l'expression des gènes PK-L et PK-M . . . . .	17
FIGURE 3. Séquence nucléotidique et séquence déduite en acides aminés de l'ADNc de la pyruvate kinase érythrocytaire humaine (PK-R) . . . . .	19
FIGURE 4. Principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) . . . . .	40
FIGURE 5. Représentation schématique du gène PK-L et localisation des sites d'hybridation des amorces sens et antisens utilisées pour l'étude du gène PK-L et de la déficience en pyruvate kinase érythrocytaire . . .	43
FIGURE 6. Aperçu de la procédure en deux étapes pour la génération d'ADN simple brin par PCR asymétrique . . . . .	52
FIGURE 7. Carte de restriction du phagemide pBluescript II KS+ . . . . .	57
FIGURE 8. Effet des variations de concentrations en MgCl <sub>2</sub> sur l'efficacité des réactions PCR. . . . .	78
FIGURE 9. Spécificité, rendement et purification des oligonucléotides utilisés pour l'amplification en chaîne de la polymérase . . . . .	80
FIGURE 10. Impact du choix des températures d'hybridation (T <sub>h</sub> ) sur la spécificité des réactions PCR . . . . .	81
FIGURE 11. Rôle du départ à température élevée ("hot start") lors d'une réaction PCR . . . . .	83
FIGURE 12. Impact des variations de concentrations initiales en ADN sur l'efficacité d'une réaction PCR . . . . .	85
FIGURE 13. Effet du choix commercial de l'ADN polymérase thermostable . . . . .	87
FIGURE 14. Effet des variations du rapport des concentrations des amorces utilisées pour la génération d'ADN monobrin par PCR asymétrique . .	88

FIGURE 15. Génération d'ADN monocaténaire sens versus antisens . . . . .	90
FIGURE 16. Optimisation des conditions expérimentales pour la méthode RT-PCR . . . . .	92
FIGURE 17. Comparaison des résultats d'un séquençage direct et des séquences d'un fragment d'ADN cloné . . . . .	95
FIGURE 18. Effet du choix de l'ADN polymérase et de la configuration des mélanges nucléotidiques - Rôle du DMSO . . . . .	97
FIGURE 19. Effet de l'orientation sens ou antisens de la matrice d'ADN monobrin sur l'efficacité du séquençage direct . . . . .	99
FIGURE 20. Comparaison des produits d'amplification PCR double brin du gène PK-L du patient (P) anémique A.C. et de l'individu normal (N) H.B . . . . .	101
FIGURE 21. Artéfacts rencontrés lors de l'investigation des mutations responsables de la déficience en PK-R chez A.C. . . . .	104
FIGURE 22. Identification de variants PK-R non pathologiques . . . . .	105
FIGURE 23. Séquences nucléotidiques des régions introniques comprises entre les exons R-2, 3-4, 5-6 et 8-9 . . . . .	107
FIGURE 24. Similarité des séquences introniques 3 et 8 du gène PK-L humain et de rat . . . . .	109
FIGURE 25. Comparaison des séquences promotrices PK-L humaine et de rat . . . . .	112
FIGURE 26. Amplification PCR de l'exon 6 du gène PK-L d'individus normaux ou atteints d'anémie hémolytique congénitale par déficience en pyruvate kinase érythrocytaire . . . . .	114
FIGURE 27. Etude familiale des marqueurs génétiques associés à l'anémie hémolytique congénitale par déficience en pyruvate kinase . . . . .	116
FIGURE 28. Impact d'un départ à température élevée ("hot start") sur la spécificité des produits d'amplification de l'exon 6 du gène PK-L de patients anémiques . . . . .	117

FIGURE 29. Sélection et vérification des recombinants obtenus lors du clonage des fragments supplémentaires générés par amplification PCR de l'exon 6 du gène PK-L de patients anémiques . . . . .	118
FIGURE 30. Séquence nucléotidique du clone <i>hmf1</i> . . . . .	120
FIGURE 31. Séquence nucléotidique et acides aminés déduits du clone <i>hmf2</i> . . . . .	121
FIGURE 32. Détection des séquences <i>hmf1</i> et <i>hmf2</i> chez des individus normaux et anémiques . . . . .	123
FIGURE 33. Analyse par "Southern blots" du marqueur génétique <i>hmf2</i> . . . . .	125
FIGURE 34. Analyse par "Southern blots" du marqueur génétique <i>hmf1</i> . . . . .	126
FIGURE 35. Analyse de l'expression du gène <i>hmf2</i> par "Northern blots" . . . . .	128
FIGURE 36. Immunoprécipitation de la pyruvate kinase érythrocytaire . . . . .	132
FIGURE 37. Photomicrographie électronique à balayage d'un échantillon sanguin frais prélevé chez A.C. . . . .	138
FIGURE 38. Photomicrographie électronique à balayage d'un échantillon sanguin frais prélevé chez A.C. . . . .	140
FIGURE 39. Profils d'hydrophobicité du facteur interféron- $\alpha$ A de boeuf et du marqueur génétique <i>hmf2</i> humain . . . . .	153

# LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 1. Classification étiologique et pathogénique des maladies hémolytiques congénitales .....	8
TABLEAU 2. Signes biologiques des anémies hémolytiques héritées .....	11
TABLEAU 3. Propriétés des isoenzymes de la PK de mammifères .....	15
TABLEAU 4. Classification des sujets recrutés pour les études génétiques ..	28
TABLEAU 5. Données cliniques recueillies chez les 5 patients anémiques étudiés .....	29
TABLEAU 6. Amorces de synthèse pour l'amplification du gène PK-L par PCR .....	44
TABLEAU 7. Variations des températures utilisées lors des expériences de PCR standard à partir d'ADN génomique lymphocytaire .....	48
TABLEAU 8. Composition des tampons et milieux de culture utilisés pour la préparation des cellules compétentes et leur transformation ...	62
TABLEAU 9. Investigation des anomalies génétiques responsables de la déficience en PK-R chez A.C.: sommaire des régions de l'isoenzyme PK-R amplifiées, clonées et séquencées .....	102
TABLEAU 10. Séquences aux sites d'épissage et de branchement des introns 1, 3, 5 et 8 du gène PK-L .....	108
TABLEAU 11. Paramètres cinétiques de la PK-R partiellement purifiée .....	133
TABLEAU 12. Alignement de séquences homologues aux éléments régulateurs PKL-I, -II et -III du promoteur L humain .....	147
TABLEAU 13. Résumé des facteurs transcriptionnels, cytokines et récepteurs contrôlant l'érythropoïèse .....	156

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

## 1. Unités de mesure

g	Force centrifuge ou gramme
Kb	Kilobases
KDal	KiloDaltons
M	Molarité
pb	Paires de bases
pmoles	Picomoles
Vol	Volume

## 2. Acides aminés

Ala	Alanine
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Acide aspartique
Cys	Cysteine
Gln	Glutamine
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
His	Histidine
Ile	Isoleucine
Leu	Leucine
Lys	Lysine
Met	Méthionine
Phe	Phénylalanine
Pro	Proline
Ser	Sérine
Thr	Thréonine
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
Val	Valine

### 3. Autres abréviations

A	Antisens
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	Acide déoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AHCNS	Anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire
AMV	<i>Avian myeloblastosis virus</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Adénosine trophosphatase
BFU-E	Burst forming unit-erythroid
BOVIFN- $\alpha$ A	Bovine interferon- $\alpha$ A
BSA	Bovine serum albumine
cAMP	Adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique
CAT	Chloramphénicol acétyltransférase
CFU-E	Colony forming unit-erythroid
CSF	Colony stimulating factor
db	Double brin
DEAE	Diéthylaminoéthyl
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Déoxynucléotides triphosphates
DO	Densité optique
2,3-DPG	2,3-diphosphoglycérate
E	Exon
EDTA	Ethylènediamine tétraacétate de sodium
EtOH	Ethanol
EU	Enzyme units
F-1,6-P <sub>2</sub>	Fructose-1,6-diphosphate
F-6-P	Fructose-6-phosphate
FCS	Fetal calf serum
FSB	Freezing Solution Buffer
G-3-P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
G-6-PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GSH	Glutathion, forme réduite
GSSG	Glutathion, forme oxydée
GTG	Genetic Technology Grade
Hb	Hémoglobine
Hct	Hématocrite
Hepes	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazinediéthanesulfonique
<i>Hmf1</i>	Hemolysis related factor 1

<i>Hmf2</i>	Hemolysis related factor 2
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside
K <sup>+</sup>	Potassium
KCl	Chlorure de potassium
LF	Liver factor
M	Marqueur de poids moléculaires
MAPPING	Message amplification phenotyping
Mg <sup>+2</sup>	Magnésium
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
MLTV	Major late transcription virus
MMuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
Na <sup>+</sup>	Sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NaOH	Hydroxyde de sodium
NF	Nuclear factor
n <sub>H</sub>	Coefficient de Hill
P	Pyruvate
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFr	Platelet derived growth factor receptor
PEP	Phosphoénolpyruvate
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PK	Pyruvate kinase
PK-L	Pyruvate kinase de type L (L: liver)
PK-M	Pyruvate kinase de type M (M: muscle)
PK-R	Pyruvate kinase de type R (R: red blood cells)
R-5-P	Ribose-5-phosphate
RNasine	Ribonucléasine
RT	Reverse transcriptase
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
S	Sens
sb	Simple brin
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SSC	Sodium saline citrate
T.N.	Température normale
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TC	Tissu culture
T <sub>d</sub>	Température de dissociation
T <sub>h</sub>	Température d'hybridation
Tris	Tris hydroxyméthyl aminométhane
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside
8§	Section

# SOMMAIRE

---

Université de Sherbrooke

L'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire  
par déficience en pyruvate kinase (PK)

par

André Larochelle

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

Septembre 1992

**L'** anémie hémolytique résulte d'une fragilité anormale du globule rouge. L'intégrité cellulaire des érythrocytes dépend d'une assemblée protéique appartenant à plusieurs systèmes fonctionnels distincts. De nombreuses enzymopathies décrites pour chacun de ces systèmes ont été associées à des syndromes hémolytiques. Le déficit en pyruvate kinase érythrocytaire (PK-R), une pathologie héréditaire transmise par récessivité autosomique, est le plus commun des défauts enzymatiques associés à l'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire (AHCNS).

La présence d'une mutation PK-R originale ou précédemment décrite a

été scrutée chez un patient d'origine Québécoise (A.C.) présentant le phénotype d'une condition hémolytique sévère. La région codante et certaines séquences introniques de l'isoenzyme PK-R ont été investiguées selon une méthodologie initialement optimisée, et impliquant notamment la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), le clonage des fragments d'ADN issus des amplifications PCR ou leur séquençage direct. L'analyse génétique, compliquée par l'introduction d'artéfacts de séquences, a révélé l'absence de mutations structurales spécifiques au patient A.C. Des analyses cinétiques et immunologiques complémentaires aux études génétiques décrites, ont permis d'élaborer l'hypothèse d'une mutation portant sur les régions régulatrices du gène PK-L, spécifiques à l'isoenzyme érythrocytaire. Une corrélation est envisageable entre la nature de la mutation, la sévérité du tableau clinique et l'aspect morphologique des globules rouges anormaux, tel qu'observé par microscopie électronique à balayage.

Trois variants non pathologiques (<sup>388</sup>ACC→TCC; <sup>393</sup>ATA→ATC; <sup>1267</sup>CGG→GCG) ont été systématiquement identifiés chez l'individu anémique et tous les sujets normaux testés d'origine Canadienne-Française, soulevant à chaque fois l'épineuse question des erreurs publiées versus polymorphismes naturels. Certaines évidences favorisent la première alternative. La mutation silencieuse (<sup>1705</sup>AGG→CGG) rapportée au sein des populations japonaises a également été identifiée chez un sujet d'origine vietnamienne établi en Estrie. Le même polymorphisme était absent des génomes Canadiens-Français testés, suggérant, pour ce variant, une hétérogénéité allélique spécifique aux populations orientales.

La séquence du promoteur spécifique à l'isoenzyme PK-L est rapportée. Des séquences fortement homologues aux éléments régulateurs PKL-I (L1), PKL-II (L3) et PKL-III (L4) du promoteur L identifiés chez le rat, ont été reconnues en des positions équivalentes du promoteur L humain. De même, une séquence du promoteur correspond à plus de 80% à un élément de réponse aux hydrates de carbone ("carbohydrate response element") caractérisé chez le rat par son implication dans le contrôle du gène par la diète et les hormones. Cette conservation des séquences entre espèces suggère un mode de contrôle similaire de la spécificité hépatique de l'expression du gène PK-L.

Au cours des travaux portant sur l'identification des mutations, des bandes supplémentaires sont spécifiquement apparues dans le patron électrophorétique de la réaction d'amplification PCR impliquant l'exon 6 de 4 patients sur 5. Ces fragments n'ont pas été générés avec sept individus contrôles et 2 sujets hétérozygotes pour le déficit en pyruvate kinase, suggérant une relation étroite des séquences supplémentaires avec la condition hémolytique des patients. Ces marqueurs génétiques, désignés *hmf1* et *hmf2* ("hemolysis related factors 1 et 2"), ont été clonés puis séquencés. Ils couvrent des séquences de 346 (*hmf1*) et 351 (*hmf2*) paires de bases homologues respectivement à la région 3' non codante du gène du récepteur PDGF (PDGFr) et à la région 5' codante du gène de l'interféron- $\alpha$ A de boeuf (BOVIFN- $\alpha$ A). La comparaison des profils d'hydrophobicité des acides aminés correspondants des protéines *hmf2* et BOVIFN- $\alpha$ A révèle leur similarité structurelle. Par buvardage de type "Northern", un ARNm de 3,2Kb est également détecté pour *hmf2*.

Les fragments supplémentaires amplifiés sont générés à partir d'une seule des deux amorces utilisées pour l'amplification de l'exon 6 (PKLS6). En modifiant les conditions PCR de l'exon 6, les bandes supplémentaires sont également détectées chez les individus asymptomatiques. L'hypothèse d'un réarrangement, spécifique aux sujets anémiques, des gènes correspondant aux marqueurs *hmf1* et *hmf2* est proposée pour expliquer ces résultats.

La nature déduite des gènes *hmf1* et *hmf2* combinée aux évidences de leur réarrangement chez les patients anémiques, suggèrent une implication physiologique des deux marqueurs génétiques. Nous proposons leur appartenance au système responsable de l'érythropoïèse, dans un but compensatoire de l'anémie hémolytique. Certaines coïncidences suggèrent également la corrélation des réarrangements *hmf1* et *hmf2* avec les mécanismes de l'oncogénèse.

# INTRODUCTION

---

## 1. L'érythrocyte mature

L'étude du sang est déjà très ancienne. En 1674, le biologiste hollandais Leeuwenhoek décrivit pour la première fois les érythrocytes du sang humain. Leur signification fonctionnelle ne devait pourtant s'élucider que deux siècles plus tard, lorsque Hoppe-Seyler mis en évidence la capacité de l'hémoglobine à fixer et libérer rapidement l'oxygène (Wintrobe, 1990a).

Le globule rouge mature humain est métaboliquement défavorisé. Anucléé au-delà du stade de différenciation réticulocytaire, le globule rouge est dépourvu d'organites cytoplasmiques (ribosomes, mitochondries, etc...), il ne possède que d'inefficaces vestiges de la machinerie enzymatique essentielle aux réactions oxydatives intramitochondriales, il est incapable de se diviser et d'assurer la synthèse de novo de protéines, lipides ou d'ATP.

Au repos, l'hématie humaine normale a l'aspect d'une sphère aplatie avec une invagination bilatérale souvent désignée "disque biconcave". A défaut d'organelles soutenant les processus de transcription et de traduction cellulaires, l'érythrocyte est incapable d'affronter indéfiniment les agressions dont il est victime; sa durée de vie correspond à celle de ses composantes. Les érythrocytes normaux circulent quelque 120 jours avant leur destruction splénique ou intravasculaire (Wintrobe, 1990c).

L'intégrité cellulaire du globule rouge dépend d'une assemblée protéique

appartenant à cinq systèmes fonctionnels distincts: 1- le système de transport de l'oxygène; 2- celui responsable des échanges extracellulaires et de la forme érythrocytaire; et les systèmes impliqués dans 3- la génération d'énergie; 4- la réparation des dommages oxydatifs; et 5- le métabolisme des nucléotides (de Médicis, 1991; Wintrobe, 1990d).

### **1.1 Le système de transport de l'oxygène**

Les phénomènes de combustion sont essentiels à la vie des mammifères qui nécessite un apport continu en oxygène et l'élimination simultanée du dioxyde de carbone. Les globules rouges assurent le transport des gaz respiratoires entre les poumons et les tissus, un processus requérant ni gain, ni perte d'énergie. Cette unique fonction physiologique des érythrocytes est médiée par l'hémoglobine, une protéine représentant 95% de leur poids sec.

### **1.2 Le système responsable des échanges extracellulaires et de la forme érythrocytaire**

Les mécanismes d'échanges extracellulaires sont médiés par certaines protéines de la membrane érythrocytaire. La présence de transporteurs membranaires est généralement acceptée pour expliquer la vitesse, la spécificité ou la cinétique de saturation du transport du glucose ou d'autres monosaccharides. La membrane plasmique des hématies est relativement peu perméable aux principaux cations monovalents, sodium et potassium, dont les mouvements sont majoritairement liés à un mécanisme de transport actif. La principale pompe cationique, l'adénosine triphos-

phatase- $\text{Na}^+\text{K}^+$  ( $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase), fonctionne en échangeant le sodium intracellulaire avec le potassium extracellulaire, aux dépens d'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Wintrobe, 1990a).

Pendant les quatre mois de son périple à travers l'organisme, le globule rouge doit être souple et robuste à la fois. Souple, afin de négocier le franchissement d'étroits capillaires et notamment les sinus spléniques; robuste, pour subir les turbulences sanguines régnant dans les gros vaisseaux. C'est une assemblée moléculaire, désignée squelette érythrocytaire, qui confère aux hématies les caractéristiques attendues. Ses protéines, principalement l'actine, la spectrine, l'ankyrine et la protéine 4.1, tapissent la face interne de la membrane plasmique (Delaunay et Dhermy, 1990).

### **1.3 Les systèmes de génération d'énergie, de réparation des dommages oxydatifs et du métabolisme des nucléotides**

En l'absence de mitochondries, la glycolyse anaérobie (ou voie d'Embden-Meyerhof) rencontre les besoins énergétiques des hématies. La voie aérobie des pentoses phosphates (ou shunt des hexoses monophosphates) et celle du glutathion appartiennent au système de réparation des dommages oxydatifs. De même, le métabolisme des nucléotides assure l'homéostasie du compartiment érythrocytaire des nucléotides de l'adénine. La figure 1 illustre les principales réactions associées à chacune de ces voies métaboliques.

La glycolyse anaérobie amène la conversion simple du glucose en lactate avec formation parallèle de trois composés importants: le NADH, cofacteur de la méthé-



moglobine réductase; l'ATP, principal nucléotide phosphate à haute énergie; et le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG), régulateur de la fonction de l'hémoglobine. La dégradation d'une mole de glucose assure la production de deux moles de NADH. Les quantités d'ATP et de 2,3-DPG produites dépendent toutefois de l'activité du shunt Rapoport-Luebering, une voie de dérivation particulière aux globules rouges. Dans les conditions optimales, chaque mole de glucose métabolisée s'associe à la génération nette de deux moles d'ATP. Cette production nette peut néanmoins diminuer en fonction de la quantité de 2,3-DPG produite. La concentration du triose influence l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et représente plus de la moitié du phosphate organique érythrocytaire (Grimes et al, 1964).

Les hématies sont également pourvues d'une voie glycolytique aérobie, le shunt des pentoses phosphates. Sa fonction est double. Il catalyse d'une part la conversion des hexoses en pentoses par les glucose-6-phosphate (G-6P) et glucose-6-phosphogluconate (6-PG) déshydrogénases. Les pentoses générés aérobiquement rejoignent le courant glycolytique majeur via la transcétolase et la transaldolase. La voie des hexoses monophosphates assure d'autre part la synthèse puis l'oxydation et la réduction cyclique du glutathion. Cette voie fournit l'unique mécanisme significatif pour la génération du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH), un cofacteur essentiel à la réduction du glutathion oxydé. L'oxydation du glutathion s'observe lors de la conversion des peroxydes cellulaires toxiques en produits non toxiques (l'eau ou les alcools) par la machinerie enzymatique du shunt des pentoses phosphates. Le cofacteur NADPH représente donc la dernière ligne de protection

contre les attaques oxydatives. La proportion du glucose métabolisé par cette voie varie largement avec l'importance du stress oxydatif environnemental (Valentine et al, 1985; Valentine et al, 1989).

L'adénosine phosphate représente 97% des nucléotides des cellules rouges normales. Un métabolisme nucléotidique élaboré assure le maintien du compartiment des nucléotides de l'adénine. L'ARN ribosomal est dégradé par les réticulocytes normaux en nucléotides 5'-pyrimidine, ultérieurement déphosphorylés par la pyrimidine 5'-nucléotidase. De même, l'adénosine est successivement phosphorylée par l'adénosine kinase puis l'adénylate kinase, ou désaminée en inosine par l'adénosine déaminase (figure 1) (Wintrobe, 1990e).

## **2. Les anémies hémolytiques congénitales**

### **2.1 Pathogénie et classification**

Le nombre d'érythrocytes présents dans la circulation sanguine résulte d'un équilibre dynamique entre la production et la mise en circulation des érythrocytes d'une part, et leur destruction ou leur disparition de la circulation d'autre part. Une anémie est l'aboutissement d'une anomalie portant sur la production ou la destruction des hématies, ou sur les deux à la fois. Les mécanismes de l'homéostasie normale tentent de corriger l'anémie par une accélération de l'érythropoïèse. Dans certains cas, l'anémie persiste, traduisant: soit une érythropoïèse diminuée ou virtuellement absente; soit une érythropoïèse stimulée mais inefficace n'aboutissant pas à la production et à la libération d'érythrocytes matures dans la circulation; soit enfin une

érythropoïèse maximale mais néanmoins insuffisante pour compenser une perte de globules rouges, qu'il s'agisse d'hémorragies ou d'une hyperdestruction érythrocytaire.

Cette augmentation de la destruction des hématies est responsable des anémies hémolytiques. Les pathologies hémolytiques résultent d'une fragilité anormale des globules rouges, conséquence d'une anomalie intrinsèque de la cellule elle-même, ou de l'action d'agents extrinsèques sur des cellules normales. Les anémies hémolytiques érythrocytaires congénitales ou héréditaires se partagent en cinq catégories, selon la voie métabolique ou le système atteint (§ 1). On décrit ainsi des anomalies de la membrane et du cytosquelette, des anomalies de la glycolyse, du métabolisme des nucléotides, du shunt des pentoses phosphates, et de l'hémoglobine (tableau 1).

## **2.2 Manifestations cliniques**

En dépit d'un nombre élevé de maladies hémolytiques constitutionnelles (tableau 1), les manifestations cliniques en rapport avec l'hémolyse qui leur est associée sont souvent les mêmes. Les principaux symptômes cliniques sont en rapport avec l'intensité de l'anémie, l'ictère (ou jaunisse), la survenue de crises, la splénomégalie et le développement de lithiases biliaires. Les ulcères de jambes et les anomalies osseuses sont des manifestations également rencontrées, mais peu fréquentes (Wintrobe, 1990d).

La sévérité d'une anémie est très variable d'un patient à l'autre. Chez les individus profondément atteints, le diagnostic est généralement posé peu après la naissance ou pendant les premières années de la vie. Les manifestations les plus habituelles

**TABEAU 1. CLASSIFICATION ETIOLOGIQUE ET PATHOGENIQUE DES MALADIES HEMOLYTIQUES CONGENITALES\***

<p><b>A. Anomalies des protéines membranaires et du cytoquelette</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sphérocytose héréditaire</li> <li>2. Elliptocytose héréditaire</li> <li>3. Abêtalipoprotéïnémie (acanthocytose)</li> <li>4. Stomatocytose héréditaire</li> <li>5. Déficit en lécithine cholestérol acyl transférase</li> <li>6. Pyropoïkilocytose héréditaire</li> <li>7. Anémie hémolytique par augmentation de la phosphatidyl choline</li> <li>8. Maladie Rh<sub>null</sub></li> <li>9. Phénotype McLeod</li> <li>10. Déficit en adénosine triphosphatase</li> </ol>	<p><b>C. Anomalies du métabolisme des nucléotides érythrocytaires</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Déficit en pyrimidine 5'-nucléotidase</li> <li>2. Excès d'adénosine désaminase</li> <li>3. Déficit en adénylate kinase</li> </ol>
<p><b>B. Déficit des enzymes de la glycolyse</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Pyruvate kinase</b></li> <li>2. Hexokinase</li> <li>3. Glucose phosphate isomérase</li> <li>4. Phosphofructokinase</li> <li>5. Triosephosphate isomérase</li> <li>6. Phosphoglycérate kinase</li> <li>7. Fructose diphosphate aldolase</li> </ol>	<p><b>D. Déficit des enzymes de la voie des pentoses phosphates et du métabolisme du glutathion</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Glucose-6-phosphate déshydrogénase</li> <li>2. Glutamyl-cystéine synthétase</li> <li>3. Glutathion synthétase</li> <li>4. Glutathion réductase</li> </ol> <p><b>E. Anomalies de la structure et de la synthèse de la globine</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hémoglobines instables</li> <li>2. Drépanocytose</li> <li>3. Autres hémoglobinopathies homozygotes (CC,DD, EE)</li> <li>4. Thalassémie majeure</li> <li>5. Hémoglobine H</li> <li>6. Maladies par double hétérozygotisme (hémoglobine SC, thalasso-drépanocytose, etc.)</li> </ol>

\* D'après Wintrobe (1990d)

sont une pâleur intense et des signes cardiovasculaires en rapport avec l'anémie, la sévérité de ces derniers pouvant justifier le recours aux transfusions sanguines. Plus souvent, l'anémie est modérée ou minime, la diminution de la durée de vie des érythrocytes étant partiellement compensée par l'augmentation de l'activité médullaire. Les malades tolèrent souvent bien leur condition hémolytique et la symptomatologie peut être pauvre. Dans ces cas, ce n'est que plus tard dans l'enfance qu'un diagnostic est établi. Enfin, la maladie peut être ignorée jusqu'à l'âge adulte, avant qu'un ictère, une crise ou les complications d'une lithiase n'attirent l'attention.

Dans certains cas, l'ictère est remarqué dès la période néonatale. Chez beaucoup d'enfants plus âgés et d'adultes atteints d'anémie hémolytique congénitale, l'ictère est absent ou suffisamment modéré pour passer inaperçu. Chez d'autres, l'ictère est chronique mais ne devient jamais intense.

Dans les maladies hémolytiques constitutionnelles, de longues périodes relativement asymptomatiques peuvent être ponctuées d'épisodes d'anémie aiguë, d'ictères ou d'autres manifestations de ce que l'on appelle les "crises". Habituellement, ces épisodes semblent déclenchés par une infection intercurrente, notamment des voies aériennes supérieures. Le plus souvent, ces crises sont la conséquence d'une diminution transitoire de la production érythrocytaire (crises érythroblastiques). Elles peuvent également résulter d'une augmentation de la destruction érythrocytaire, probablement par stimulation de l'activité splénique (crises hémolytiques).

La rate est souvent augmentée de volume (splénomégalie) chez les sujets anémiques. Généralement, l'augmentation de volume est minime ou modérée et

permet de retracer la maladie à l'occasion d'un examen clinique de routine.

Enfin, le développement de calculs biliaires et leurs complications peuvent jouer un rôle primordial dans la symptomatologie des anémies hémolytiques congénitales. La lithiase biliaire a été observée chez de jeunes enfants, mais elle est rare avant la puberté. Sa fréquence augmente avec l'âge des patients.

## **2.3 Signes biologiques**

Les signes biologiques au cours de l'anémie hémolytique héréditaire sont partagés en deux groupes: 1- les signes en rapport avec l'augmentation de la destruction érythrocytaire; et 2- ceux en relation avec l'augmentation compensatrice de l'érythropoïèse (Wintrobe, 1990a) (tableau 2).

### **2.3.1 Manifestations en rapport avec l'hyperhémolyse**

La durée de vie des érythrocytes (tableau 2.I.A) peut être mesurée par la méthode de marquage par le chrome 51 (Ebaugh et al, 1953). Leur demi-vie est presque toujours réduite dans les maladies hémolytiques; l'importance de cette diminution varie cependant d'un patient à l'autre. Même si la demi-vie est en général d'autant plus diminuée que l'anémie est sévère, la corrélation n'est pas toujours étroite. Les mesures de durée de vie sont rarement nécessaires puisque l'importance de la destruction s'apprécie habituellement par l'analyse de données plus simples, et notamment les déterminations répétées de l'intensité de l'anémie, la réticulocytose et l'ictère.

Lorsque les érythrocytes sont détruits dans la circulation, mais aussi lorsque la

**TABLEAU 2. SIGNES BIOLOGIQUES DES ANEMIES HEMOLYTIQUES HERITEES\***

I. Signes biologiques d'hyperhémolyse	II. Signes biologiques d'érythropoïèse accélérée
A. Diminution de la durée de vie des érythrocytes	A. Sanguins
B. Signes d'hémolyse intravasculaire	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hyperréticulocytose (polychromatophilie, ponctuations)</li> <li>2. Macrocytose</li> <li>3. Erythroblastose</li> <li>4. Hyperleucocytose et thrombocytose</li> </ol>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hémoglobulinémie</li> <li>2. Absence de l'haptoglobine</li> <li>3. Hémoglobulinurie</li> <li>4. Hémosidérinurie</li> <li>5. Méthalburinémie</li> <li>6. Diminution de l'hémopexine sérique</li> </ol>	B. Médullaires
C. Augmentation du catabolisme de l'hème	C. Ferrocinétiques
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Augmentation de la bilirubinémie non conjuguée</li> <li>2. Augmentation de la production endogène de monoxyde de carbone</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Augmentation du renouvellement du fer plasmatique</li> <li>2. Augmentation du renouvellement du fer érythrocytaire</li> </ol>
D. Augmentation de l'activité de la lactate déshydrogénase sérique	D. Biochimiques
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Augmentation de la créatine érythrocytaire</li> <li>2. Augmentation de l'activité de certains enzymes érythrocytaires: uroporphyrine I synthétase, hexokinase, glutamate oxalate transaminase</li> </ol>

\* *D'après Wintrobe (1990a)*

destruction extravasculaire est si rapide que les capacités du système macrophagique sont dépassées, l'hémoglobine est libérée dans le plasma. L'hémoglobine est éliminée par différents mécanismes et des anomalies biologiques caractéristiques sont retrouvées (tableau 2.I.B). La partie hémique de l'hémoglobine est rapidement catabolisée, et les principaux métabolites de l'hème - la bilirubine et le monoxyde de carbone - sont proportionnellement augmentés. Ces modifications sont très utiles pour apprécier l'hémolyse (tableau 2.I.C).

Enfin, l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase sérique (LDH) est souvent stimulée au cours de l'anémie hémolytique. L'augmentation de la LDH est la conséquence d'une libération de l'enzyme érythrocytaire dans le plasma au cours de l'hémolyse (tableau 2.I.D).

### **2.3.2 Manifestations en rapport avec l'érythropoïèse accélérée**

L'augmentation des réticulocytes circulants est l'un des signes les plus simples et les plus sûrs d'érythropoïèse accélérée (tableau 2.II.A). Les réticulocytes sont des érythrocytes jeunes contenant des ribosomes. Le plus souvent, les taux de réticulocytes sont exprimés en pourcentage du nombre total d'hématies dans l'échantillon sanguin examiné. Ainsi exprimées, les valeurs normales s'échelonnent de 0,8 à 2,5% chez les hommes et de 0,8 à 4,1% chez les femmes (Deiss et Kurth, 1970). Dans la plupart des anémies hémolytiques congénitales, les taux réticulocytaires atteints sont bien corrélés avec la sévérité du processus.

D'autres signes biologiques secondaires constituent également des marqueurs utiles de l'âge cellulaire. Ces indicateurs d'érythropoïèse accélérée, regroupés au

tableau 2.II, appartiennent aux domaines sanguins, médullaires, ferrocinétiques et biochimiques.

### **3. Le déficit en pyruvate kinase (PK)**

La définition des syndromes hémolytiques secondaires aux enzymopathies érythrocytaires tire ses racines d'études culminant sur la reconnaissance de la déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PD) (Carson et al, 1956), et d'investigations initiées par Dacie et ses collègues (Dacie et al, 1953; Selwyn et Dacie, 1954) puis poursuivies par d'autres (De Gruchy et al, 1958; De Gruchy et al, 1960; Robinson et al, 1961) de certaines anémies héréditaires désignées *non sphérocytaires* ou *atypiques* pour les distinguer des désordres congénitaux sphérocytaires mieux caractérisés. La première déficience enzymatique, et aujourd'hui la mieux connue, de la glycolyse anaérobie incriminée dans la pathogénèse de l'anémie hémolytique constitutionnelle, concerne la pyruvate kinase (PK) (Valentine et al, 1961; Tanaka et al, 1962).

#### **3.1 La pyruvate kinase**

##### **3.1.1 Caractérisation de la protéine**

La pyruvate kinase (ATP: pyruvate 2-O-phosphotransférase EC 2.7.1.40) est un enzyme clé de la glycolyse anaérobie. Il constitue un point de contrôle important du taux de production d'ATP par cette voie (Valentine et al, 1989).

Agissant à la dernière étape de la voie glycolytique, la pyruvate kinase catalyse

la conversion irréversible du phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate (P) par addition d'un proton ( $H^+$ ) et la perte d'un groupement phosphate transféré du PEP à l'ADP en présence des ions mono- et bivalents  $K^+$  et  $Mg^{+2}$  (figure 1).

L'enzyme est caractérisé par une faible spécificité nucléotidique et les 5'-diphosphates de la guanosine, de l'inosine, de l'uridine et de la cytidine peuvent également tenir place de phospho-accepteurs (Muirhead, 1990).

La structure générale de la pyruvate kinase, un tétramère formé de sous-unités identiques de 50 à 60 Kdal, est conservée chez les bactéries, les mammifères et les organismes eucaryotes moins évolués (Valentine et al, 1989).

Différents isoenzymes de la pyruvate kinase sont connus. Chez les mammifères, quatre isoenzymes ont été caractérisés et nommés L, R,  $M_1$  et  $M_2$  (Tanaka et al, 1967; Imamura et Tanaka, 1972; Nakashima et al, 1974). Ces isozymes diffèrent par certaines propriétés (tableau 3) et notamment par la spécificité des tissus ou cellules dans lesquels ils sont produits. La production des différents isoenzymes de la pyruvate kinase chez les mammifères, dépend du stade de développement de l'individu. La forme  $M_2$  est la seule présente dans les tissus foetaux au début de l'embryogénèse. Dans les tissus adultes, la pyruvate kinase de type L est retrouvée dans le foie, les reins et les intestins, et le type  $M_1$  au niveau des muscles squelettiques, du coeur et du cerveau. L'isoenzyme PK-R ne se retrouve que dans les érythrocytes; les leucocytes, les plaquettes et la plupart des tissus adultes contiennent le type  $M_2$  (Valentine et al, 1989).

TABLEAU 3. PROPRIETES DES ISOENZYMES DE LA PYRUVATE KINASE DE MAMMIFERES\*

Caractéristique	Type d'isoenzyme			
	L	R	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>
Poids moléculaire (Kdal)	208-220	212-220	250	216
Cinétique (PEP)	Sigmoïdale	Sigmoïdale	Hyperbolique	Sigmoïdale
Activation par F-1,6-P <sub>2</sub>	Oui	Oui	Non	Oui
Inhibition par ATP	Oui	Oui	Non	Non
Phosphorylation cAMP- dependante <sup>‡</sup>	Oui	Oui	Non	Non
Inhibition par Ala	Oui	Non	Non	Oui
Inhibition par Phe	Oui	Non	Non	Oui
Neutralisation de l'Ac				
Anti-L	Oui	Oui	Non	Non
Anti-R	Oui	Oui	Non	Non
Anti-M <sub>1</sub>	Non	Non	Oui	Oui
Anti-M <sub>2</sub>	Non	Non	Oui	Oui
Régulation hormonale				
Glucagon	Inhibition	-	-	-
Catécholamines	Inhibition	-	-	-
Insuline	Stimulation	-	-	-
Spécificité tissulaire	Foie Reins Intestins	Globules rouges	M. squelet. Coeur Cerveau	Tissus foetaux Tissus adultes

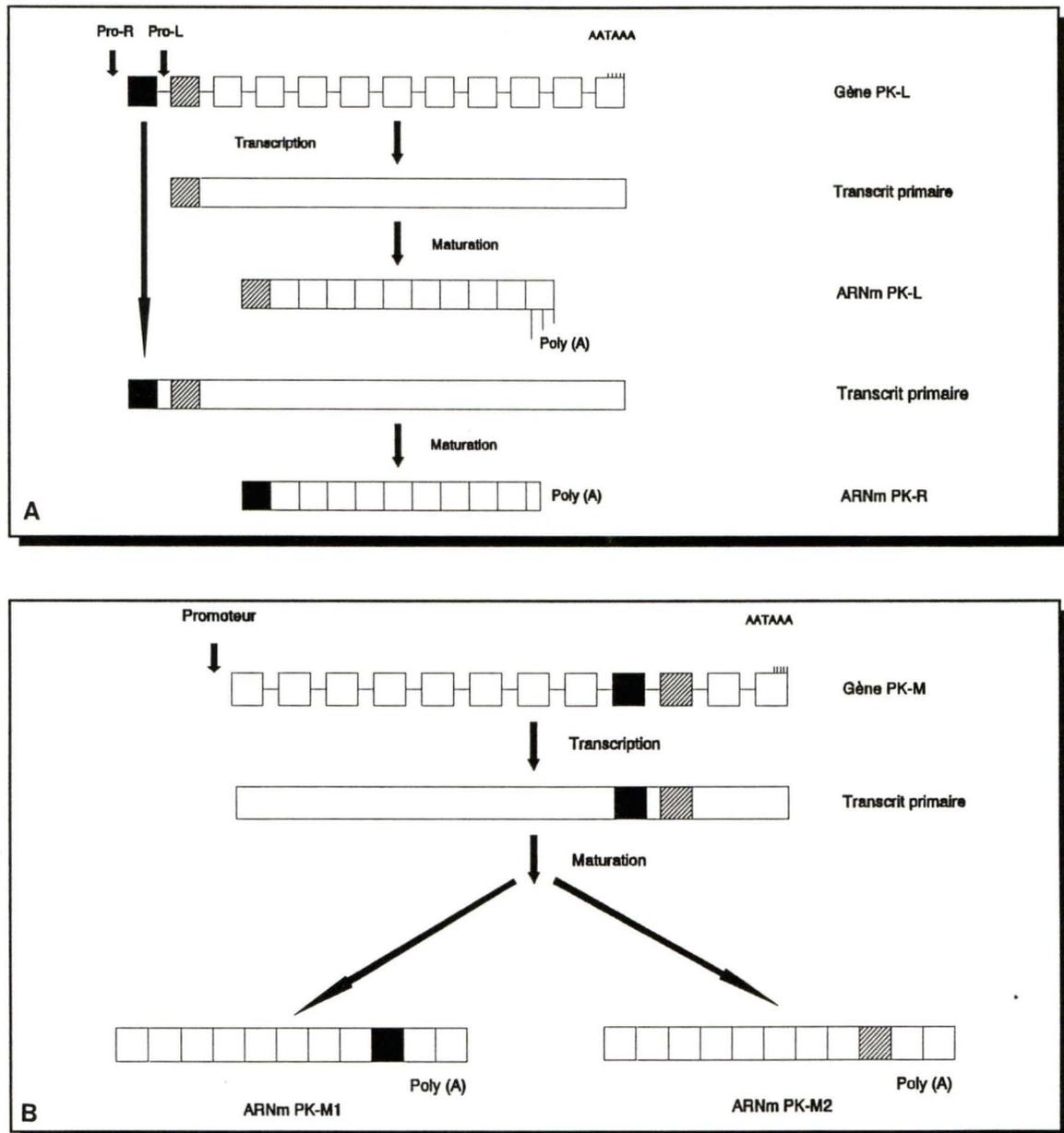
\* D'après Imamura et Tanaka (1982)

‡ Westhead et al (1984)

### 3.1.2 Caractérisation génétique

Deux gènes (PK-L et PK-M) sont nécessaires à la production des quatre isoenzymes de la pyruvate kinase des mammifères. Issus d'une divergence évolutive récente, les deux gènes partagent la même structure génétique (ils comptent douze exons) et se caractérisent par une homologie de séquence élevée. Ils sont également présents en une copie par génome haploïde. Les isoenzymes L et R proviennent de l'utilisation alternative de deux promoteurs différents situés à l'extrémité 5' du gène PK-L; les deux ARNm matures n'ont plus qu'onze exons et diffèrent par leur premier exon (figure 2.A) (Noguchi et al, 1987). Les isoenzymes M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> sont plutôt produits par l'épissage alternatif d'ARNm issus du gène PK-M; leur neuvième exon diffère (figure 2.B) (Noguchi et al, 1986). Les gènes PK-L et PK-M ont respectivement été assignés aux positions chromosomiques 1q21 (Satoh et al, 1988) et 15q22 (Tani et al, 1988b).

Chez l'humain, la déficience en pyruvate kinase érythrocytaire (PK-R) est responsable de l'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire (AHCNS). Depuis déjà quelques années, il était accepté que le déficit en PK-R devait provenir de mutations situées dans la partie codante du gène PK-L. Ce n'est toutefois que tout récemment qu'un certain nombre de mutations structurales ont pu être détectées et des séquences de gènes mutants publiées (Kanno et al, 1991; Neubauer et al, 1991; Kanno et al, 1992). La détermination des séquences complètes des ADNc PK-L et PK-R a constitué un prélude indispensable à cette clarification génétique du déficit en pyruvate kinase érythrocytaire (Tani et al, 1988a, Kanno et al, 1991). L'ADNc



**FIGURE 2.** Représentation schématique de l'expression des gènes *PK-L* et *PK-M*.

**A. Gène *PK-L*.** Les exons spécifiques aux isoenzymes *PK-R* (exon R) et *PK-L* (exon L) sont désignés par des boîtes pleines et hachurées, respectivement. Les exons communs aux deux ARNm sont représentés par des boîtes vides. La séquence AATAAA représente le signal de polyadénylation; plusieurs signaux sont présents dans la région 3' non codante du dernier exon. Pro-R et Pro-L: promoteurs spécifiques aux isoenzymes *PK-R* et *PK-L*, respectivement.

**B. Gène *PK-M*.** Les exons spécifiques aux isoenzymes *PK-M1* et *PK-M2* sont désignés par des boîtes pleines et hachurées, respectivement. Les exons communs aux deux isoenzymes sont représentés par des boîtes vides. Le signal de polyadénylation est montré (AATAAA).

PK-R complet dénombre 2060 paires de bases, desquelles 1722 codent pour 574 acides aminés, 3 bases figurent pour le codon de terminaison, 39 nucléotides appartiennent à la région 5' non codante et 296 à la portion 3' non codante (figure 3). La similarité des isoenzymes PK-R humain et de rat atteint 91,5% pour les séquences en acides aminés et 86,4% au niveau nucléotidique (Kanno et al, 1991). La comparaison des séquences PK-L fournit des pourcentages comparables (86,9 et 92,4%, respectivement) (Tani et al, 1988a).

### **3.2 Fréquence et répartition géographique du déficit en PK-R**

La plupart des déficits en pyruvate kinase ont été rapportés chez des sujets originaires d'Europe du Nord; la déficience a néanmoins une répartition géographique mondiale. Une fréquence particulièrement élevée est retrouvée parmi les Amishs de Pennsylvanie chez qui la transmission de la maladie a pu être reconstituée à partir d'un seul couple d'immigrants (Bowmann et al, 1965). Les Noirs Américains (Zuelzer et al, 1968) et les individus originaires du Bassin Méditerranéen sont moins souvent atteints. Les formes mutantes de l'enzyme sont aussi plus fréquentes au Japon et en Chine (Fung et al, 1969).

Au Québec, le registre de la déficience en pyruvate kinase compte 56 patients, fixant la prévalence à 1:117 296. La fréquence est plus élevée dans l'Est du Québec, 1:81 838. Cinquante patients sont d'origine Canadienne-Française; la portion restante est composée d'immigrants récents, un de Lettonie, un d'Italie, un du Portugal, deux de Grèce et un d'Haïti. Une étude généalogique préliminaire a également révélé la

[-39] TATTCCATGGTCCCGCAGCCCCAGGCCACACTGAAAGC [-1]

R

ATG TCG ATC CAG GAG AAC ATA TCA TCC CTG CAG CTT CGG TCA TGG GTC TCT AAG TCC CAA AGA GAC TTA GCA AAG TCC ATC CTG ATT GGG [90 ]  
Met Ser Ile Gln Glu Asn Ile Ser Ser Leu Gln Leu Arg Ser Trp Val Ser Lys Ser Gln Arg Asp Leu Ala Lys Ser Ile Leu Ile Gly [30 ]

2

GCT CCA GGA GGG CCA GCG GGG TAT CTG CGG CGG GCC AGT GTG GCC CAA CTG ACC CAG GAG CTG GGC ACT GCC TTC TTC CAG CAG CAG CAG [180 ]  
Ala Pro Gly Gly Pro Ala Gly Tyr Leu Arg Arg Ala Ser Val Ala Gln Leu Thr Gln Glu Leu Gly Thr Ala Phe Phe Gln Gln Gln Gln [160 ]

CTG CCA GCT GCT ATG GCA GAC ACC TTC CTG GAA CAC CTC TGC CTA CTG GAC ATT GAC TCC GAG CCC GTG GCT GCT CGC AGT ACC AGC ATC [270 ]  
Leu Pro Ala Ala Met Ala Asp Thr Phe Leu Glu His Leu Cys Leu Leu Asp Ile Asp Ser Glu Pro Val Ala Ala Arg Ser Thr Ser Ile [90 ]

3

ATT GCC ACC ATC GGG CCA GCA TCT CGC TCC GTG GAG CGC CTC AAG GAG ATG ATC AAG GCC GGG ATG AAC ATT GCG CGA CTC AAC TTC TCC [360 ]  
Ile Ala Thr Ile Gly Pro Ala Ser Arg Ser Val Glu Arg Leu Lys Glu Met Ile Lys Ala Gly Met Asn Ile Ala Arg Leu Asn Phe Ser [120 ]

4

CAC GGC TCC CAC GAG TAC CAT GCT GAG ACC ATA GCC AAC GTC CGG GAG GCG GTG GAG AGC TTT GCA GGT TCC CCA CTC AGC TAC CGG CCC [450 ]  
His Gly Ser His Glu Tyr His Ala Glu Thr Ile Ala Asn Val Arg Glu Ala Val Glu Ser Phe Ala Gly Ser Pro Leu Ser Tyr Arg Pro [150 ]

5

GTG GCC ATC GCC CTG GAC ACC AAG GGA CCG GAG ATC CGC ACT GGG ATC CTG CAG GGG GGT CCA GAG TCG GAA GTG GAG CTG GTG AAG GGC [540 ]  
Val Ala Ile Ala Leu Asp Thr Lys Gly Pro Glu Ile Arg Thr Gly Ile Leu Gln Gly Pro Glu Ser Glu Val Glu Leu Val Lys Gly [180 ]

TCC CAG GTG CTG GTG ACT GTG GAC CCC GCG TTC CGG ACG CGG GGG AAC GCG AAC ACC GTG TGG GTG GAC TAC CCC AAT ATT GTC CGG GTC [630 ]  
Ser Gln Val Leu Val Thr Val Asp Pro Ala Phe Arg Thr Arg Gly Asn Ala Asn Thr Val Trp Val Asp Tyr Pro Asn Ile Val Arg Val [210 ]

6

GTG CCG GTG GGG GGC CGC ATC TAC ATT GAC GAC GGG CTC ATC TCC CTA GTG GTC CAG AAA ATC AGC CCA GAG GGA CTG GTG ACC CAA GTG [720 ]  
Val Pro Val Gly Gly Arg Ile Tyr Ile Asp Asp Gly Leu Ile Ser Leu Val Val Gln Lys Ile Ser Pro Glu Gly Leu Val Thr Gln Val [240 ]

GAG AAC GGC GGC GTC CTG GGC AGC CGG AAG GGC GTG AAC TTG CCA GGG GCC CAG GTG GAC TTG CCC GGG CTG TCC GAG CAG GAC GTC CGA [810 ]  
Glu Asn Gly Gly Val Leu Gly Ser Arg Lys Gly Val Asn Leu Pro Gly Ala Gln Val Asp Leu Pro Gly Leu Ser Glu Gln Asp Val Arg [270 ]

GAC CTG CGC TTC GGG GTG GAG CAT GGG GTG GAC ATC GTC TTT GCC TCC TTT GTG CGG AAA GCC AGC GAC GTG GCT GCC GTC AGG GCT GCT [900 ]  
Asp Leu Arg Phe Gly Val Glu His Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Ser Phe Val Arg Lys Ala Ser Asp Val Ala Ala Val Arg Ala Ala [300 ]

7

CTG GGT CCG GAA GGA CAC GGC ATC AAG ATC ATC AGC AAA ATT GAG AAC CAC GAA GGC GTG AAG AGG TTT GAT GAA ATC CTG GAG GTG AGC [990 ]  
Leu Gly Pro Glu Gly His Gly Ile Lys Ile Ser Lys Ile Glu Asn His Glu Gly Val Lys Arg Phe Asp Glu Ile Leu Glu Val Ser [330 ]

GAC GGC ATC ATG GTG GCA CGG GGG GAC CTA GGC ATC GAG ATC CCA GCA GAG AAG GTT TTC CTG GCT CAG AAG ATG ATG ATT GGG CGC TGC [1080 ]  
Asp Gly Ile Met Val Ala Arg Gly Asp Leu Gly Ile Glu Ile Pro Ala Glu Lys Val Phe Leu Ala Gln Lys Met Met Ile Gly Arg Cys [360 ]

8

AAC TTG GCG GGC AAG CCT GTT GTC TGT GCC ACA CAG ATG CTG GAG AGC ATG ATT ACC AAG CCC CGG CCA ACG AGG GCA GAG ACA AGC GAT [1170 ]  
Asn Leu Ala Gly Lys Pro Val Val Cys Ala Thr Gln Met Leu Glu Ser Met Ile Thr Lys Pro Arg Pro Thr Arg Ala Glu Thr Ser Asp [390 ]

GTC GCC AAT GCT GTG CTG GAT GGG GCT GAC TGC ATC ATG CTG TCA GGG GAG ACT GCC AAG GGC AAC TTC CCT GTG GAA GCG GTG AAG ATG [1260 ]  
Val Ala Asn Ala Val Leu Asp Gly Ala Asp Cys Ile Met Leu Ser Gly Glu Thr Ala Lys Gly Asn Phe Pro Val Glu Ala Val Lys Met [420 ]

9

CAG CAT CGG ATT GCC CGG GAG GCA GAG GCC GCA GTG TAC CAC CGG CAG CTG TTT GAG GAG CTA CGT CGG GCA GCG CCA CTA AGC CGT GAT [1350 ]  
Gln His Arg Ile Ala Arg Glu Ala Glu Ala Ala Val Tyr His Arg Gln Leu Leu Arg Arg Ala Ala Pro Leu Ser Arg Asp [450 ]

10

CCC ACT GAG GTC ACC GCC ATT GGT GCT GTG GAG GCT GCC TTC AAG TGC TGT GCT GCT GCC ATC ATT GTG CTG ACC ACA ACT GGC CGC TCA [1440 ]  
Pro Thr Glu Val Thr Ala Ile Gly Ala Val Glu Ala Ala Phe Lys Cys Cys Ala Ala Ala Ile Ile Val Leu Thr Thr Thr Gly Arg Ser [480 ]

GCC CAG CTT CTG TCT CGG TAC CGA CCT CGG GCA GCA GTC ATT GCT GTC ACC CGC TCT GCC CAG GCT GCC CGC CAG GTC CAC TTA TCC CGA [1530 ]  
Ala Gln Leu Leu Ser Arg Tyr Arg Pro Arg Ala Ala Val Ile Ala Val Thr Arg Ser Ala Gln Ala Ala Arg Gln Val His Leu Cys Arg [510 ]

11

GGA GTC TTC CCC TTG CTT TAC CGT GAA CCT CCA GAA GCC ATC TGG GCA GAT GAT GTA GAT CGC CGG GTG CAA TTT GGC ATT GAA AGT GGA [1620 ]  
Gly Val Phe Pro Leu Leu Tyr Arg Glu Pro Pro Glu Ala Ile Trp Ala Asp Asp Val Asp Arg Arg Val Gln Phe Gly Ile Glu Ser Gly [540 ]

AAG CTC CAG ATG GAG CTA CGT GTT GGA GAC CTG GTG ATT GTG GTG ACA GGC TGG CGA CCT GGT TCC GGC TAC ACC AAC ATC ATG AGG GTG [1710 ]  
Lys Leu Arg Gly Phe Leu Arg Val Gly Asp Leu Val Ile Val Val Thr Gly Trp Arg Pro Gly Ser Gly Tyr Thr Asn Ile Met Arg Val [570 ]

CTA AGC ATA TCC [1722] TGA GACGCCCTCCCCCTCTGGCCAGCCCTACCCTTGATCCCCATCCCTTCTCCCCAGTCTACGTTCTCCAGCCACACCCCTCCAAAG [1815]  
Leu Ser Ile Ser [574] Trm

CCACCTTTAAGTCTCTCTCTCTATTCTGACCCTCCCTACCTGAGGCCATCTGAGACTATAACTGTCATCTAGCCCCCTCGAGGTTGCCCTTCCCATCTCCATTTACAC [1930]  
AGGTCCTGAAAGTCTGTGTCAAATTATGCACCTGGCCACCAACAGCACCAATTGTACATTCCTGCACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA [2021]

**FIGURE 3.** Séquence nucléotidique et séquence déduite en acides aminés de l'ADNc de la pyruvate kinase érythrocytaire humaine (PK-R). Les nucléotides sont numérotés à partir de la première base du codon d'initiation de la traduction, et les nucléotides composant la région 5' non codante sont identifiés par des nombres négatifs. Les acides aminés sont numérotés à partir du résidu méthionine d'initiation de la traduction. Le résidu glycine en caractère gras est le premier acide aminé commun aux types R et L. Les bases soulignées définissent le début de chaque exon et sont surmontées du numéro de l'exon correspondant; ces positions ont arbitrairement été assignées à la première base du premier codon des exons. Pour l'isoenzyme PK-L, les 99 bases de l'exon 1 (ou R) du type PK-R sont remplacées par 6 nucléotides (ATG GAA) (Tani et al, 1988; Kanno et al, 1991)

présence de consanguinité pour deux patients et une relation entre les familles de deux autres patients (de Médicis et al, 1992).

### **3.3 Génétique**

Transmise tel un caractère autosomique récessif, la maladie atteint les sexes masculin et féminin avec la même fréquence, et les formes avec manifestations cliniques s'observent chez les homozygotes ou les doubles hétérozygotes (Valentine et al, 1961). Les hétérozygotes vraisemblables ne présentent que rarement une maladie hémolytique transitoire (Bossu et al, 1968) ou modérée (Fung et al, 1969; Kahn et al, 1976; Miwa et al, 1975).

On peut distinguer deux classes de mutations. La première concerne la régulation de l'expression et résulte de mutations dans les promoteurs ou les facteurs trans. Ces mutations sont dominantes et l'isoenzyme M est souvent exprimé en même temps ou en remplacement de l'isoenzyme R. Il en résulte le syndrome de l'ATP élevé ("High ATP syndrome"). La seconde classe de mutations concerne le gène structural. Ces mutations sont récessives et multiples. En effet, on trouve plusieurs défauts moléculaires de la PK-L, tels la perte d'activité, la diminution de l'affinité pour les substrats (PEP et ADP), une modification des propriétés allostériques (coefficient de Hill, inhibition par l'ATP, activation par le F-1,6-P<sub>2</sub>), une diminution de la stabilité et une modification des migrations électrophorétiques. Il est donc probable que la plupart des patients soient des hétérozygotes doubles.

### **3.4 Physiopathologie**

Lors d'un déficit en pyruvate kinase, les concentrations des métabolites intermédiaires de la glycolyse en amont du blocage sont augmentées, et notamment celles du 2,3-DPG responsable d'une déviation vers la droite de la courbe de dissociation de l'hémoglobine (Grimes et al, 1964).

La diminution de la durée de vie des érythrocytes résulterait de la différence entre la capacité de régénération de l'ATP et les besoins énergétiques. L'ATP disponible ne suffisant plus à couvrir les besoins en énergie, les pompes membranaires ne peuvent plus maintenir les gradients cationiques. Initialement, les pertes en potassium dépassent les entrées de sodium. La perte d'eau nécessaire pour maintenir l'équilibre osmotique entraîne une rétraction cellulaire et une modification de la forme de la cellule parfois accompagnée d'une formation de spicules. Chez certaines de ces cellules, les altérations membranaires sont irréversibles et se caractérisent chimiquement par une augmentation du calcium membranaire, fonctionnellement par une accélération de la perte potassique, et sur le plan structural, par une perte de plasticité (Leblond et al, 1978). Ces cellules déshydratées, déformées et rigides sont alors prématurément détruites.

### **3.5 Manifestations cliniques**

Contrairement à beaucoup d'autres maladies constitutionnelles, le déficit en PK est cliniquement hétérogène, allant d'un ictère néonatal prononcé avec besoins d'exsanguino-transfusions multiples, à une hyperhémolyse parfaitement compensée

dépistée de façon tout à fait fortuite chez l'adulte (Valentine et al, 1961). Si les variations entre les sujets atteints de différentes familles sont remarquables, des variations importantes à l'intérieur d'une même famille sont également bien démontrées (Zuelzer et al, 1968).

Il n'existe pas de manifestations cliniques particulières au déficit en pyruvate kinase. Les signes et symptômes sont ceux retrouvés au cours des anémies hémolytiques chroniques (§ 2.2). L'anémie de degré variable, l'ictère et la splénomégalie sont la règle.

### **3.6 Données biologiques**

L'anémie au cours d'un déficit en PK s'accompagne habituellement d'une concentration réduite en hémoglobine comprise entre 60 et 120 g/l, d'un hématocrite abaissé oscillant entre 17 et 37% (Tanaka et Paglia, 1971). Des fluctuations modérées sont possibles, particulièrement chez les nourrissons et les jeunes enfants. Avant splénectomie (ablation de la rate) (§ 3.8), le taux de réticulocytes est compris entre 2,5 et 15%,; après splénectomie, des taux jusqu'à 56% ne sont pas rares (Tanaka et Paglia, 1971). De plus, tous les stigmates morphologiques d'érythropoïèse accélérée peuvent être rencontrés: polychromatophilie, anisocytose, poïkilocytose (Keitt, 1966; Miwa et Nagata, 1965), acantocytose (Leblond et al, 1978; Oski et al, 1964), échinocytose (Nathan et al, 1965).

### **3.7 Diagnostic**

Puisque ni le tableau clinique, ni les anomalies hématologiques du déficit en PK

ne sont caractéristiques, le diagnostic repose essentiellement sur les mesures quantitatives de l'activité enzymatique.

Le dosage enzymatique par essai couplé à la lactico-déshydrogénase donne des niveaux d'activité spécifique (exprimée par mg d'hémoglobine) très variables dans la population normale. Une activité spécifique égale à 75% de l'activité spécifique moyenne est généralement considérée comme la limite de la normalité (de Médicis, 1991).

La déficience héréditaire en pyruvate kinase est diagnostiquée lorsque le taux de pyruvate kinase est inférieur à la moyenne chez le patient et ses parents. La plupart des sujets présentant un déficit ont une activité de l'ordre de 5 à 25% de l'activité normale moyenne. Les porteurs hétérozygotes de variants de la PK ont approximativement des valeurs correspondant à la moitié des valeurs normales.

La corrélation entre l'activité enzymatique mesurée et la sévérité clinique de la maladie est faible (Grimes et al, 1964). Il est étonnant de constater la présence de certains patients homozygotes présentant une activité PK supérieure à celle de leurs parents hétérozygotes. Ceci s'explique du fait que les globules rouges des patients hémolytiques sont plus jeunes, en moyenne, que ceux des parents asymptomatiques, et que l'activité pyruvate kinase décline avec l'âge des globules rouges (de Médicis, 1991). Des études de l'affinité enzyme-substrat, des analyses cinétiques et immunologiques peuvent être utiles pour reconnaître certains enzymes mutants.

### **3.8 Traitement**

Pendant les premières années de la vie, une anémie sévère sera au mieux traitée par des transfusions érythrocytaires. La splénectomie (ablation de la rate) offre la possibilité d'un contrôle à long terme de l'anémie.

La splénectomie améliore la condition hémolytique sans pourtant l'éliminer (Keitt, 1966; Oski et al, 1965; Tanaka et Paglia, 1971). Les besoins transfusionnels, lorsqu'ils existaient avant l'intervention, diminuent ou disparaissent. Une diminution progressive de l'hémoglobine peut également survenir. Il persiste chez tous les malades une hyperhémolyse incomplètement compensée, comme en témoigne l'augmentation des réticulocytes après l'acte chirurgical.

Les réticulocytes doivent supporter un long temps de séjour dans la rate, où l'oxygène et le glucose peuvent être si rares qu'ils empêchent toute phosphorylation oxydative du glucose (Mentzer et al, 1971). Les cellules incapables de générer l'ATP par la glycolyse anaérobie sont donc condamnés à une destruction presque immédiate dans la rate, ou dans le foie lorsqu'ils ont pu traverser la rate. Les réticulocytes très déficitaires en PK survivent donc mieux en l'absence de rate, ce qui explique l'hypermélocytose permanente suivant la splénectomie (Tanaka et Paglia, 1971).

## **4. Intérêts et objectifs du projet de recherche**

De nombreux variants enzymatiques génétiquement déterminés sont bien établis dans la pathogénèse d'un grand spectre de syndromes hémolytiques. L'anémie hémolytique congénitale par déficit en pyruvate kinase est la plus fréquente des

anémies hémolytiques congénitales non sphérocytaires; elle constitue la première érythroenzymopathie après le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase. Dans les dix années qui suivirent la description originale de la maladie, plus de cent cas ont été publiés et rassemblés (Tanaka et Paglia, 1971) et l'on peut admettre aujourd'hui que plusieurs centaines de cas sont connus qui ne sont plus rapportés.

La relation entre la structure primaire des enzymes et leur activité est un domaine qui s'est enrichi récemment sur les acquis d'études des produits de gènes mutants. Au début des présents travaux, la pyruvate kinase constituait l'un des seuls enzymes de la glycolyse pour lequel l'effet des mutations sur l'activité enzymatique n'avait pas été étudié. En effet, des mutations de l'hexokinase, de la glucose phosphate déshydrogénase, de la phosphofructokinase, de l'aldolase et de la triose phosphate isomérase étaient déjà décrites. L'intérêt d'étudier le comportement de la pyruvate kinase vient de sa structure tridimensionnelle en baril bêta qui est homologue à l'aldolase et à la triose phosphate isomérase, rendant ainsi possible la comparaison de l'effet des mutations, non seulement par rapport à l'enzyme intact, mais aussi par rapport à une foule d'enzymes homologues et leurs variants.

Récemment, des lésions génomiques ont été décrites pour la pyruvate kinase au sein de populations japonaises (Kanno et al, 1991; Kanno et al, 1992), libanaises et turques (Neubauer et al, 1991). Au Québec, la prévalence de la maladie est notable dans l'Est de la province, avec une indication de consanguinité dans les généalogies de certains patients. Cette observation justifiait l'entreprise de travaux pouvant mener à l'identification d'une mutation PK dans une population où le phénotype est

relativement homogène. Peu de populations ont été identifiées avec un indice de consanguinité suffisant pour soupçonner une déficience unique en pyruvate kinase, susceptible d'être caractérisée au niveau moléculaire.

L'objectif majeur du projet de recherche vise ainsi l'étude du gène PK-L en vue de l'identification des mutations PK responsables du déficit enzymatique observé chez un patient Québécois (A.C.) présentant les signes et symptômes d'une condition hémolytique profonde.

En regard à l'objectif prévu, de tels travaux nous exposent au développement et à l'optimisation préalable de conditions expérimentales adéquates, et notamment pour les outils moléculaires modernes tels l'amplification en chaîne de la polymérase (PCR) et le séquençage direct de produits PCR.

Au détour de ces travaux, de nouvelles orientations de recherche se sont dessinées. Deux nouveaux marqueurs génétiques, désignés *hmf1* et *hmf2*, ont été associés à l'état hémolytique de certains sujets, fournissant les bases d'un second objectif: la caractérisation de ces marqueurs et l'investigation de leur rôle dans la pathologie hémolytique congénitale.

# MATERIEL ET METHODES

---

## 1. Sujets étudiés

### 1.1 Classification

Des prélèvements sanguins ont été pratiqués chez 25 sujets volontaires recrutés au Québec dans les régions administratives du Saguenay-Lac-St-Jean, de l'Estrie et de Québec. Ces 25 individus, désignés au tableau 4 par leurs initiales et un numéro de famille, y sont regroupés selon leur statut clinique: sujets anémiques (patients), ou normaux (contrôles). Leur matériel génétique, isolé des cellules sanguines nucléées (§ 3.1), a servi aux études: 1- de la déficience en pyruvate kinase érythrocytaire (mutations); 2- du gène PK-L (promoteur, introns); et/ou 3- des marqueurs génétiques associés à l'anémie hémolytique héréditaire (*hmf1* et *hmf2*) (tableau 4).

### 1.2 Données cliniques

Les dossiers de tous les patients Québécois, dont l'activité PK-R est connue, ont été revus (de Médicis et al, 1992). Leur statut enzymatique a été déterminé selon la méthode recommandée par le Comité International pour la Standardisation en Hématologie (Miwa et al, 1979). Les activités PK-R, testées à l'Hôpital Victoria de Montréal et à l'Hôpital St-Sacrement de Québec, ont conduit au diagnostic de 56 sujets déficients en pyruvate kinase, au Québec. Les données cliniques recueillies chez 5 de ces patients (ME.Du., G.G., A.C., N.Boi. et Ma.G.) sont présentées au tableau 5. Leur portrait clinique est également résumé par les études de cas suivantes.

TABLEAU 4. CLASSIFICATION DES SUJETS RECRUTES POUR LES ETUDES GENETIQUES

Famille (F)	Sujet	Statut clinique	Lieu de recrutement	Etude (s)§
F10	ME.Du.	Patient	Saguenay-Lac-St-Jean	1, 2, 3
F25	G.G.	Patient	Québec	3
F27	A.C.	Patient	Québec	1, 2, 3
F35	N.Boi.	Patient	Saguenay-Lac-St-Jean	1, 3
F41	Ma.G.	Patient	Saguenay-Lac-St-Jean	1, 2, 3
F1	E.d.M.	Contrôle	Estrie	3
F6	D.B.	Contrôle	Estrie	3
F6	Y.B.	Contrôle	Estrie	3
F7	H.B.	Contrôle	Estrie	1, 3
F7	A.G.	Contrôle	Estrie	3
F10	G.Du.	Contrôle	Saguenay-Lac-St-Jean	1
F10	S.G.	Contrôle	Saguenay-Lac-St-Jean	1
F23	A.L.	Contrôle	Estrie	3
F23	N.L.	Contrôle	Estrie	3
F23	J.R.	Contrôle	Estrie	3
F25	P.G.	Patient	Québec	2
F27	S.C.	Contrôle	Québec	1
F27	L.P.	Contrôle	Québec	1
F35	G.Boi.	Contrôle	Saguenay-Lac-St-Jean	1
F35	P.B.	Contrôle	Saguenay-Lac-St-Jean	1
F35	ME.Boi.	Contrôle	Saguenay-Lac-St-Jean	1
F41	Mi.G.	Contrôle	Saguenay-Lac-St-Jean	1, 3
F41	N.Bou.	Contrôle	Saguenay-Lac-St-Jean	1, 3
F41	F.G.	Contrôle	Saguenay-Lac-St-Jean	1, 3
F52	T.L.N.	Contrôle	Estrie*	2

§ Etudes: 1- Déficience en pyruvate kinase (mutations)

2- Gène PK-L (promoteur, introns)

3- Marqueurs génétiques associés à l'AHCNS (*hmf1* et *hmf2*)

\* Sujet d'origine asiatique établi en Estrie

TABLEAU 5. DONNEES CLINIQUES RECUEILLIES CHEZ LES 5 PATIENTS ANEMIQVES ETUDIES

Famille	Age/Sexe	Activ. spécif. de PK-R (% de l'activ. norm.)			% rétic.*	Splén.§	Hb <sup>¶</sup> g/l	Hct. <sup>■</sup> (%)
		Patient	Père	Mère				
F10	4/F	52	N.D. <sup>‡</sup>	N.D.	29	Non	77	24
F25	26/F	99	N.D.	N.D.	2	Oui	134	35
F27	7/M	20	25	27	34	Oui	69	20
F35	8/M	55	59	76	N.D.	Non	N.D.	N.D.
F41	9/M	57	6	48	34	Non	N.D.	N.D.

\* % rétic. : % de réticulocytes

§ Splén. : splénectomie

¶ Hb : concentration en hémoglobine (au diagnostic)

■ Hct : hématocrite (au diagnostic)

‡ N.D. : non disponible

Patiente ME.Du.

ME.Du. a 4 ans. Elle présente, depuis la naissance, un tableau évocateur d'anémie sévère: ictère néonatal avec besoin de transfusions sanguines multiples, faible concentration en hémoglobine (77 g/l), hématocrite abaissé (24%) et taux anormal de réticulocytes (29%). Son dossier rapporte également une bactériémie à l'âge de 9 mois. La reconstitution des généalogies l'a reconnue homozygote vraie pour le déficit en pyruvate kinase. L'activité spécifique de la PK-R est abaissée de moitié par rapport à l'activité moyenne normale.

Patiente G.G.

G.G., 26 ans, est atteinte d'anémie hémolytique congénitale d'origine inconnue; on suspecte une sphérocytose. Son activité PK-R est normale (99%). Les mesures des concentrations érythrocytaires révèlent des valeurs comparables à celles rencontrées chez un adulte asymptomatique (Wintrobe, 1990b): % réticulocytes 2%, Hb 134 g/l et hématocrite 35%. Splénectomisée en 1974, à l'âge de 8 ans, la patiente subit encore des transfusions sanguines répétées. En 1985, G.G. donnait naissance à un nourrisson prématuré avec ictère néonatal; le diagnostic d'anémie hémolytique congénitale était retenu pour le bambin également. Son état nécessite de multiples transfusions et la splénectomie est envisagée.

Patient A.C.

A.C., 7 ans, est né à Québec au terme d'une deuxième grossesse normale. Une jaunice accompagnée d'hémolyse sévère ont été observées après la naissance du nourrisson; des transfusions mensuelles étaient nécessaires. A l'âge d'un an, l'examen

clinique révélait un subictère conjonctif, une anémie profonde, une hépatosplénomégalie, de même qu'un taux élevé de ferritine. A 4 ans, la gravité de son atteinte indiquait la nécessité d'une splénectomie. La splénectomie n'a eu que peu d'effets sur la condition hémolytique d'A.C. L'opération a favorisé l'accroissement du taux de réticulocytes (de 4 à 34%), mais l'enfant requiert toujours des transfusions multiples (200 ml d'un culot globulaire déleucocyté) à intervalles de 3 ou 4 semaines. Les valeurs typiques avant transfusion sont présentées au tableau 5: Hb 69 g/l et hématocrite 20%. Son activité PK-R est 16% de l'activité moyenne normale. Les parents asymptomatiques montrent des valeurs correspondantes de 27 et 25%.

#### Patient N.Boi.

N.Boi. est né en décembre 1983. Ses antécédents familiaux sont peu notables: absence de consanguinité, d'anémie et de sphérocytose. Les grands-parents maternels du patient présentent une lithiase hépatique. Une hypercholestérolémie est également observée du côté paternel de l'enfant. L'anémie a été diagnostiquée à l'âge de 3 ans. Un état de fatigue persistant, une urine brunâtre et la détection d'une splénomégalie confirmaient le diagnostic. Il n'a pas été noté d'ictère hémolytique. Les analyses enzymatiques révélaient un abaissement important de l'activité spécifique de la PK-R chez le patient et ses parents asymptomatiques (tableau 5).

#### Patient Ma.G.

Ma.G., 9 ans, est le cadet d'une famille de 2 enfants. Né au terme d'une grossesse normale, le patient présentait une jaunisse sévère à la naissance. Le suivi au long cours a montré la survenue de crises hémolytiques requérant des transfusions

nombreuses. Par palpation, une splénomégalie a également été détectée. L'enfant, homozygote vrai pour le déficit en PK, présente une activité spécifique PK-R (57%) supérieure à celle de ses parents (tableau 5). Malgré son activité PK-R anormalement réduite (6%), la mère ne montre aucun symptôme apparent d'anémie hémolytique.

## **2. Préparation d'une banque de plasma-lymphocytes-érythrocytes**

Des échantillons sanguins recueillis chez les sujets énumérés au tableau 4, ont servi à l'établissement d'une banque de plasma-lymphocytes-érythrocytes. Seule la fraction lymphocytaire sera utile aux études génétiques subséquentes.

### **2.1 Matériel à préparer**

On attribue un code numérique et un code de couleur à chaque patient. Le code numérique est composé de la lettre F (Famille) suivie du numéro de la famille, celui du membre dans la famille et de la date de préparation de l'échantillon (F-XX-X-XX-XX-XX). Le code de couleur est composé de deux rubans colorés autocollants.

### **2.2 Isolement du plasma**

L'isolement du plasma doit se faire sous la hotte à flux laminaire, en conditions stériles et en respectant toutes les précautions recommandées pour la manipulation du sang. Le tube de sang frais (~ 10ml) recueilli sur héparine, EDTA ou citrate, est agité 20 minutes sur nutator. Le sang frais est transféré dans un tube conique puis centrifugé 30 minutes à 2500 rpm à température du laboratoire. On doit recueillir au

moins 3ml de plasma clair par volume de 10ml de sang. Le plasma est conservé à -80°C dans un tube stérile identifié.

### **2.3 Isolement des lymphocytes**

Les éléments figurés du sang sont resuspendus dans un volume total de 20 ml TC Tris ("Tissu Culture Tris": 137mM NaCl, 5mM KCl, 0,7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,7mM CaCl<sub>2</sub> et 25mM Tris pH 7,5) et déposés sur 2 X 3,5ml de Ficoll Hypaque ou LSM, "Lymphocyte Separation Medium" (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, New Jersey). Une centrifugation sans frein de 30 minutes à 2500 rpm assure une migration différentielle des différents types cellulaires sanguins qui se séparent en plusieurs couches. Les érythrocytes, agrégés par le Ficoll, sédimentent complètement à travers la couche de LSM. La couche immédiatement au-dessus des globules rouges renferme principalement les granulocytes qui, à la pression osmotique du Ficoll-Hypaque, acquièrent une densité suffisamment élevée pour migrer à travers la solution LSM. Au contraire, en raison d'une densité moins importante, les lymphocytes sont retrouvés à l'interface entre le plasma et le Ficoll-Hypaque, en présence d'autres particules à sédimentation lente (plaquettes et monocytes).

Les couches de lymphocytes sont recueillies dans un seul tube, le reste est éliminé et le culot réservé pour l'isolement des érythrocytes. Trois lavages successifs en présence de milieu RPMI 1640 chaud avec Hapes et glutamine (Gibco BRL, Burlington, Ontario) assurent l'élimination de toutes traces de plaquettes, LSM toxique et plasma présents avec le culot lymphocytaire. A la fin du dernier lavage, les cellules

sont resuspendues dans 3ml de solution de congélation froide (8ml milieu RPMI 1640 avec Hepes et Glu), 100 $\mu$ l Pen-Strep 10%, 100 $\mu$ l EDTA 0,5M, 1ml FCS et 1ml DMSO). Les fioles peuvent être conservées indéfiniment dans l'azote liquide.

## **2.4 Isolement des érythrocytes**

En vue d'une étude des isoenzymes érythrocytaires, le culot d'érythrocytes est purifié par chromatographie sur cellulose pour le débarrasser de tout autre type cellulaire qui le contaminerait. Le protocole a été mis au point pour les familles à déficience en pyruvate kinase. Une colonne à chromatographie est préparée par ajout de 1,3g  $\alpha$ -cellulose et 0,7g cellulose microcristalline à une seringue de 20ml terminée par une pastille de papier filtre. L'équilibration de la colonne s'effectue par écoulement d'une solution isotonique pour érythrocytes (10mM Hepes pH 7,4, 4,5mM KCl, 133mM NaCl). La chromatographie des globules rouges est amorcée par ajout du culot sur un coussin de tampon isotonique à la tête de la colonne. On procède à l'élution avec le même tampon. Environ 30ml d'éluat sont recueillis et centrifugés 30 minutes à 2500 rpm, à la température normale. Par volume d'érythrocytes, on ajoute un volume de sérum AB (sérum sans anticorps d'aggrégation des globules rouges, obtenu à la banque de sang), 0,3 volume de K<sub>2</sub>EDTA (10mM EDTA ajusté à pH 7,4 avec du KOH) et un volume de solution de congélation (0,3M glucose, 0,45M sucrose ultrapur, 50mM NaCl). Pour permettre aux cellules d'équilibrer leur pression osmotique, le mélange est gardé au moins 15 minutes à température de la pièce avant d'être plongé dans l'azote liquide.

### **3. Isolement des acides nucléiques**

La réussite des analyse génétiques subséquentes dépend de l'efficacité avec laquelle les acides nucléiques sont isolés des cellules nucléées recueillies. La présente section examine les différentes méthodes employées pour l'extraction d'ADN, d'ARNm et d'ARN total à partir de sources variées.

#### **3.1 Extraction d'ADN génomique à partir des lymphocytes**

Cette procédure fait appel à la capacité des détergents à solubiliser les divers composants cellulaires, et aux enzymes protéolytiques à digérer les protéines, principalement les histones, qui, autrement, demeureraient liées à l'ADN. Higuchi (1989) détaille les étapes du protocole dans "PCR Technology".

Les membranes cytoplasmiques sont solubilisées en présence de 1% triton X-100 dans un tampon 0,32M sucrose, 10mM Tris-HCl (pH 7,5) et 5mM MgCl<sub>2</sub>. Une courte centrifugation (20 secondes) à 13000g provoque la sédimentation des noyaux libérés et ainsi l'élimination des ADN cytoplasmiques. Les étapes de lyse et de récupération des noyaux sont répétées deux autres fois. A la fin, le culot est repris dans 0,5ml d'un détergent non-ionique avec protéinase K (50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mg/ml gélatine, 0,45% NP40, 0,45% Tween 20, 6µg/ml protéinase K). Une incubation d'une heure à 50-60°C libère les protéines associées à l'ADN, puis la protéinase K est inactivée en bouillant le mélange pendant 10 minutes.

## **3.2 Extraction d'ARN total**

### **3.2.1 A partir de tissus**

Décrite par Cox (1968) et modifiée par Kahn (1981a), la méthode d'extraction au chlorure de guanidinium repose sur le fort pouvoir dissociant et dénaturant de cet anion échangé par les ARN contre les nucléoprotéines. L'extrême sensibilité des ARN aux ribonucléases justifie cependant les précautions prises au cours de cette étape: port de gants, verrerie et tampons traités au DEPC puis stérilisés à l'autoclave, travail à 4°C sauf contre-indication. Les différents tissus humains sains (foie et intestins foetaux) utilisés pour l'isolement des ARN totaux, sont obtenus après avortements thérapeutiques et conservés à -80°C.

Les échantillons congelés sont dépecés puis homogénéisés dans 15 ml/gramme de tissu d'un tampon 7M chlorure de guanidinium, 22mM acide iodoacétique, 1% lauroyl sarcosine, 1mM EDTA (pH 4,5-5) refroidi à -20°C. Un passage répété du mélange à travers une seringue terminée d'une aiguille fine assure la lyse des cellules. Les noyaux cellulaires, mitochondries et débris libérés sont éliminés par centrifugation (10 minutes, 10000g). L'ajout, au surnageant, de 0,55 volume d'EtOH et 0,1 volume d'acétate d'ammonium 2,4M pH 5, provoque la précipitation des acides ribonucléiques. Le matériel génétique est précipité en 2 incubations successives: 1 heure et demie à -20°C puis 10 minutes à -70°C. Après centrifugation à 15000g pendant 20 minutes, le culot est purifié à température de la pièce par: 1- redissolution dans 0,1 volume/gramme de tissu initial d'un tampon 7M chlorure de guanidi-

nium, 22mM acide iodoacétique, 1% lauroyl sarcosine, 1mM EDTA pH7, et 2-précipitation avec 0,55 volume d'EtOH et 0,05 volume d'acétate d'ammonium 2,4M pH 5, pendant 45 minutes à -20°C. Le précipité recueilli par centrifugation (15 minutes, 5000g, 0°C) est lavé 3 fois en présence de 0,55 volume d'EtOH et 0,1 volume d'une solution d'acétate de sodium 3M (pH 6), 1mM EDTA, 0,1% lauroyl sarcosine. Chaque précipitation dure 30 minutes à -20°C. A la fin, le culot d'acides ribonucléiques est débarrassé de toutes traces de sels par lavage à l'EtOH 80%. La dilution des ARN totaux s'effectue généralement dans un volume de 40µl d'eau stérile et la solution est conservée à -80°C jusqu'à utilisation.

La quantité d'ARN purifiée peut être évaluée par spectrophotométrie à 260nm (1 DO<sub>260</sub> ≈ 40µg ARN). Un rapport A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> compris entre 1,8 et 2,0 indique une bonne élimination protéique. Environ 1µg d'ARN total est déposé sur gel d'agarose GTG 1% (FMC BioProducts, Rockland, ME) dans un tampon TAE (40mM Tris, 2mM Na<sub>2</sub>EDTA et le pH est ajusté à 8,0 à l'aide d'acide acétique). Après électrophorèse et coloration au bromure d'éthidium 1µg/ml TAE, un rapport d'intensité au moins égal à 2 doit exister entre les ARN ribosomiaux 28S et 18S pour certifier l'intégrité des ARN de hauts poids moléculaires.

### **3.2.2 A partir de lymphocytes**

Cette méthode est une adaptation de la technique décrite par Chomczynski et Sacchi (1987). En combinant l'utilisation de thiocyanate de guanidinium et l'extraction phénol-chloroforme, la procédure rend efficace l'isolement d'ARN total à partir de faibles quantités de cellules ou tissus.

Environ  $10^7$  cellules ont servi à l'isolement de l'ARN total, tel qu'évalué par numération microscopique des lymphocytes colorés au cristal violet (0,1% cristal violet, 0,1M acide citrique). Le culot lymphocytaire est resuspendu dans 1ml de solution D (4M thiocyanate de guanidinium, 25mM citrate de sodium (pH 7), 0,5% N-lauroyl sarcosine, 0,1M 2-mercaptoéthanol), et homogénéisé par agitation vive. Séquentiellement, 0,1ml acétate de sodium 2M (pH 4), 1ml phénol équilibré avec de l'eau à pH<7 et 0,2ml d'un mélange chloroforme-alcool isoamyl (49:1) sont ajoutés à l'homogénat. Un mélange vigoureux de la suspension finale doit précéder son incubation de 15 minutes sur glace. Une centrifugation de 20 minutes à 10000g (4°C) sépare le mélange en 2 couches non miscibles: la phase organique acide retient l'ADN et les protéines; l'ARN se répartit dans la phase aqueuse. L'ajout de 1ml d'isopropanol amène la précipitation de l'ARN (1 heure à -20°C). Après centrifugation à 10000g pendant 20 minutes, le culot est repris dans 0,3ml de solution D et soumis à une seconde précipitation pour une période de 60 minutes à -20°C en présence d'un volume d'isopropanol. Le précipité est récupéré par centrifugation, resuspendu dans l'EtOH 75%, séché sous vide et dissout dans 10-20 $\mu$ l d'eau stérile selon l'utilisation. Comme précédemment (§ 3.2.1), la qualité de la préparation est évaluée sur gel d'agarose GTG 1%.

### **3.3 Extraction d'ARNm à partir de lymphocytes**

La purification de l'ARN contenant une extension poly (A) 3'OH à partir d'un extrait lymphocytaire a été effectuée par chromatographie sur une résine d'oligo (dT)

cellulose. Les étapes du protocole sont celles décrites par Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, New Jersey), fournisseur de la trousse de préparation rapide d'ARNm.

#### **4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

Décrite en 1985 par R.K. Saiki et ses collaborateurs de la firme Cetus Corporation (Emeryville, Californie) (Saiki et al, 1985), la réaction en chaîne a dès lors été l'objet d'une formidable popularité. Elle se veut une méthode rapide de synthèse *in vitro* d'acides nucléiques permettant la réplication et l'amplification spécifiques d'un segment d'ADN cible. Malgré sa simplicité théorique, la technique repose sur l'interaction complexe d'un certain nombre de composantes incluant la matrice originale d'ADN, les amorces oligonucléotidiques, l'ADN polymérase, les déoxynucléotides et un tampon de composition appropriée.

Un schéma explicatif du principe de la réaction PCR est reproduit à la figure 4. L'amplification d'une région particulière du génome requiert l'alternance de trois températures distinctes. On provoque d'abord la dénaturation des deux brins de l'échantillon d'ADN par chauffage du mélange à 94°C ou 95°C. A des températures supérieures à 95°C, la demi-vie de l'ADN polymérase est considérablement réduite (Rodu, 1990). Un abaissement de la température (45-65°C) permet, dans un second temps, l'hybridation du matériel génétique dénaturé à deux oligonucléotides de synthèse (sens et antisens) complémentaires respectivement à l'un et à l'autre des deux brins d'ADN au niveau des séquences délimitant la longueur du fragment d'in-

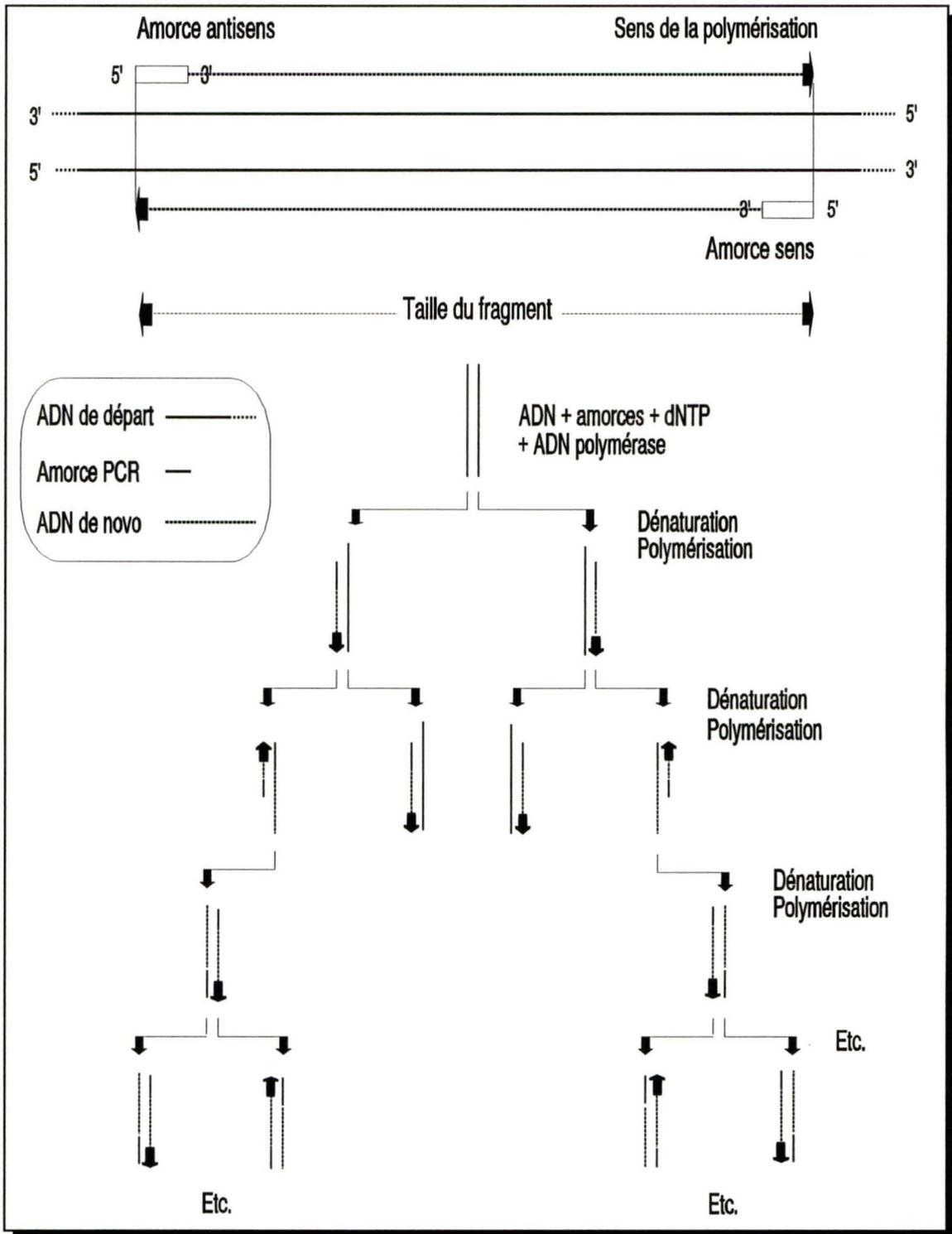


FIGURE 4. Principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

térêt. Le cycle de PCR se termine par une étape d'extension d'amorces au cours de laquelle l'ADN polymérase Taq, un enzyme isolé de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Saïki et al, 1988), recopie à haute température (70°C) des chaînes d'ADN complémentaires dont les superstructures ont toutes les chances d'être effacées, ce qui diminue les risques d'arrêt prématuré de la polymérisation. Cette opération est répétée 30 à 40 fois, aboutissant à une amplification des régions comprises entre les séquences reconnues par les deux oligonucléotides de synthèse.

La figure 4 montre qu'une amplification géométrique des produits du PCR s'observe à partir du troisième cycle. On remarque également l'utilisation des fragments d'extension nouvellement synthétisés, comme amorces pour les cycles subséquents de dénaturation-hybridation-polymérisation, résultant en l'accumulation exponentielle d'ADN spécifiquement défini par les amorces. Ainsi, en partant de 2 brins, 4 fragments monocaténares sont générés après un cycle, 8 après deux cycles, 16 après trois cycles,  $2^{n+1}$  après n cycles. En fait, le rendement n'atteint jamais 100% et, par conséquent, la multiplication est moindre. La formule réelle figurant le nombre Y de copies obtenues à partir de A copies initiales pour n cycles, le rendement de l'amplification étant R, s'écrit  $Y = A (1+R)^n$  (Chelly et al, 1988).

## 4.1 Amorces

### 4.1.1 Sélection

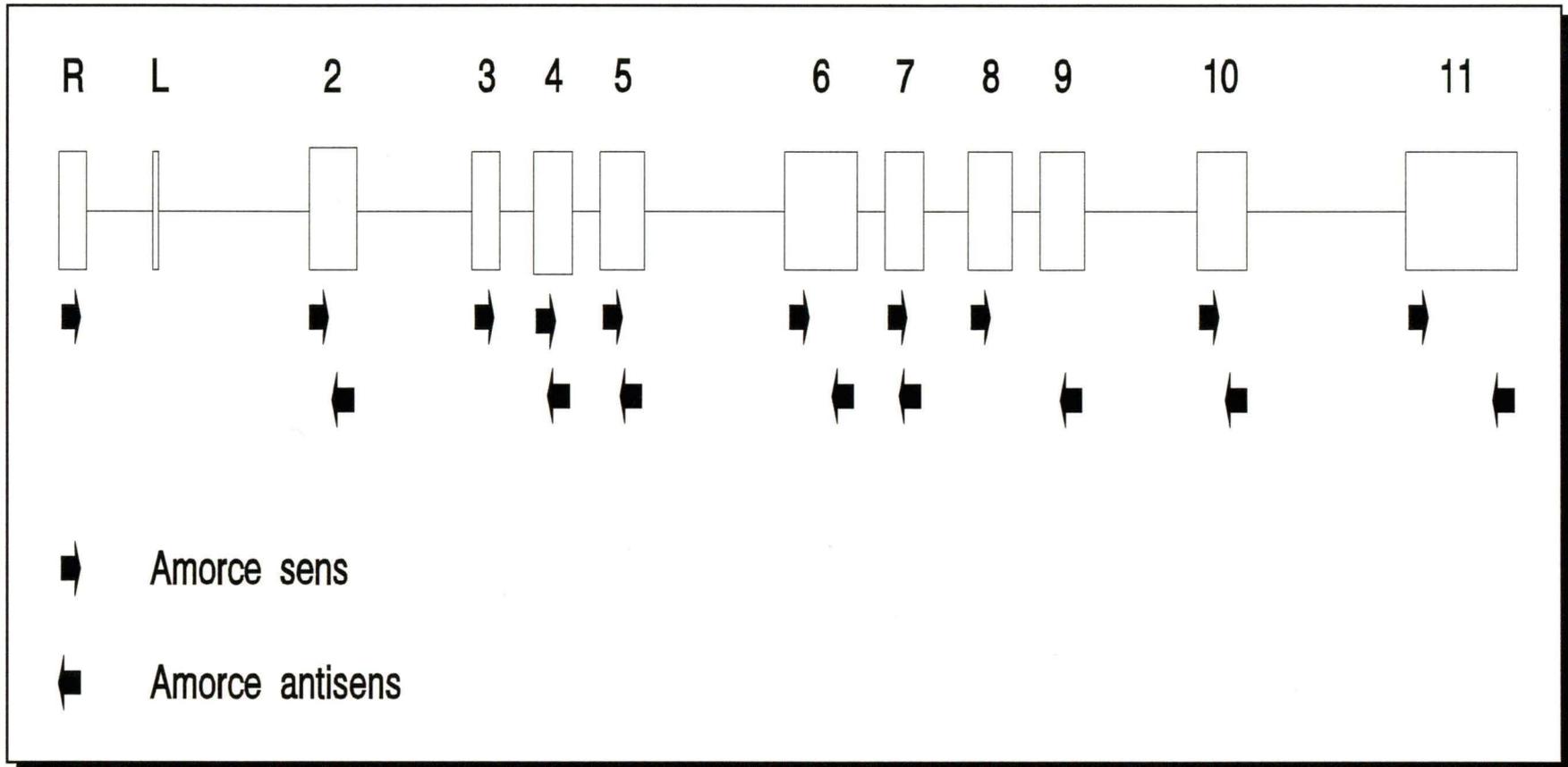
Une sélection et une synthèse appropriées des amorces oligonucléotidiques sont essentielles au succès d'une réaction PCR. Les oligonucléotides utilisés pour l'étude

du gène PK-L, de la déficience en PK-R et des marqueurs génétiques associés à l'anémie hémolytique ont été conçus selon la séquence d'ADN complémentaire (ADNc) du gène PK-L humain proposée par des investigateurs japonais (Tani et al, 1988a; Kanno et al, 1991) (figure 3). De façon générale, les amorces sens et antisens couvrent respectivement les premières et les dernières bases des séquences codantes de chaque exon. Les frontières entre exons ont été délimitées par alignement des séquences PK-L d'ADNc humain (Tani et al, 1988a) et génomique de rat (Noguchi et al, 1987). L'importance de l'homologie des gènes PK-L et PK-M humain influence également la conception des oligonucléotides: la base terminant l'extrémité 3' de chaque amorce est choisie pour ne permettre son hybridation qu'au gène PK-L, bloquant l'extension non spécifique du gène PK-M.

L'emplacement des sites d'hybridation des amorces de synthèse est schématisé à la figure 5 et repris numériquement au tableau 6 avec la séquence et la température de fusion de chaque amorce. Les réactions en chaîne de la polymérase ont été menées à des températures d'hybridation ( $T_h$ ) 3-5°C inférieures à la température de dissociation ( $T_d$ ) la moins élevée du couple d'oligonucléotides choisi ( $T_h = T_d - 3$  à 5°C).

#### **4.1.2 Purification**

Des oligonucléotides purifiés ou non sont utilisés afin d'amorcer la réaction de polymérisation en chaîne. La purification s'effectue sur gel 18% polyacrylamide-7M urée dans un tampon TBE (Tris-HCl pH7, acide borique, 1mM EDTA) (Sambrook et al, 1989a). Les amorces de synthèse, reçues sous forme lyophilisée du laboratoire



**FIGURE 5.** Représentation schématique du gène PK-L et localisation des sites d'hybridation des amorces sens et antisens utilisées pour l'étude du gène PK-L et de la déficience en pyruvate kinase érythrocytaire. Les exons du gène sont identifiés par des boîtes vides et les introns, par des traits fins. L'exon 1 spécifique à l'isoenzyme PK-R est désigné par la lettre R et celui codant pour l'isoenzyme PK-L, par la lettre L.

TABLEAU 6. AMORCES DE SYNTHÈSE POUR L'AMPLIFICATION DU GÈNE PK-L PAR PCR

Nom $\Sigma$	Séquence	Localisation ( 5'-3')*	T <sub>d</sub> §
PKRS1	5' CAG GCC CAC ACT GAA AGC 3'	-18 à -1	58
PKLS2H	5' <b>CAA GCT TGG</b> GGC CAG CGG GGT ATC TG 3'	100 à 117	54
PKLA2E	5' <b>GGA ATT CCG</b> ATG GTG GCA ATG ATG CT 3'	265 à 282	54
PKLS3	5' GGG CCA GCA TCT CGC TCC 3'	283 à 300	62
PKLS4	5' TAC CAT GCT GAG ACC ATA GC 3'	376 à 395	52
PKLA4	5' CCC CTG CAG GAT CCC AGT G 3'	489 à 507	64
PKLS5	5' AGA GTC GGA AGT GGA GCT GG 3'	508 à 532	64
PKLA5	5' GAT TTT CTG GAC CAC TAG G 3'	675 à 693	56
PKLS6	5' AGC CCA GAG GGA CTG GTG ACC 3'	694 à 714	70
PKLA6	5' CTT CAC GCC TTC GTG GTT CTC A 3'	942 à 963	68
PKLS7	5' AGG TTT GAT GAA ATC CTG GAG GT 3'	964 à 986	66
PKLA7	5' CTG TGT GGC ACA GAC A 3'	1101 à 1016	50
PKLS8	5' ATG CTG GAG AGC ATG ATT ACC 3'	1017 à 1037	62
PKLA9	5' GCC AGT TGT GGT CAG CAC A 3'	1416 à 1434	60
PKLS10	5' CGC TCA GCC CAG CTT CTG TC 3'	1435 à 1454	66
PKLA10	5' ACT TTC AAT GCC AAA TTG 3'	1600 à 1617	48
PKLS11	5' AAG CTC CGT GGC TTC CTC CGT 3'	1621 à 1641	68
PKLA11E	5' <b>GGA ATT CCG</b> GAT ATG CTT AGC ACC CT 3'	1705 à 1722	54
PKRTNC	5' CTT TCA TGT AAC TGT TAG TCA CCA 3'	3003 à 3026	66

$\Sigma$  La nomenclature des amorces réfère à l'origine de la séquence (PK-R ou PK-L), au sens de l'amorce (S pour sens, A pour antisens), au numéro de l'exon et éventuellement au site de restriction associé (E pour EcoRI, H pour HindIII: les bases correspondantes sont en caractère gras). De façon exceptionnelle, PKRTNC abrégie "pyruvate kinase, reverse transcription, non coding".

\* D'après la séquence d'ADN complémentaire de l'isoenzyme PK-R (Kanno et al, 1991; Tani et al, 1988) (figure 3). L'amorce PKRTNC est spécifique à l'isoenzyme PK-L et sa localisation exprimée selon la numérotation employée pour cet isoenzyme (Tani et al, 1988).

§ Les températures de dissociation (T<sub>d</sub>) sont évaluées par la relation  $T_d = 2^\circ\text{C} (\#A + \#T) + 4^\circ\text{C} (\#G + \#C)$  où #G, A, T ou C représentent le nombre de bases G, A, T ou C appariées à leur séquence complémentaire.

de biologie moléculaire du Dr P. Bourgaux (Université de Sherbrooke, Canada) sont redissoutes dans 100 $\mu$ l d'un tampon TE (10mM Tris-HCl pH7,5, 1mM EDTA). Une fraction du mélange (25%) est conservée non purifiée et la solution restante mélangée à un volume de formamide (Anachemia, Montréal, Québec) déionisée sur résine Dowex XG8 (BioRad, Richmond, CA) pendant 1 heure (Maniatis et al, 1982). L'échantillon est chargé en 5 puits à la tête du gel de polyacrylamide (BioRad, Mississauga, Ontario)-urée (ICN, St-Laurent, Québec) et soumis à une tension de 200 volts pour 2 heures.

Après migration, la fluorescence des bandes d'ADN non colorées au bromure d'éthidium, est révélée sous rayonnements ultra-violets (254nm). Les bandes d'intérêt sont excisées du gel et broyées dans un tampon d'élution (0,1% SDS, 0,5M NH<sub>4</sub>OAc, 10mM Mg(OAc)<sub>2</sub>). Une diffusion de l'ADN s'exerce en une nuit à température du laboratoire, avec des rendements variant de 30 à 50%. Le lendemain, l'acrylamide décheté est éliminé par centrifugation (10 minutes, 10000 rpm). L'ajout au surnageant d'un volume d'acétate d'ammonium 7,5M et 4 volumes d'EtOH absolu provoque la précipitation des amorces monobrinns en une nuit à -20°C. Une centrifugation à 14000 rpm durant 1 heure concentre l'ADN en un culot dont la concentration est évaluée par spectrophotométrie à 260nm, après dissolution dans 100  $\mu$ l du tampon TE décrit plus haut.

## 4.2 PCR standard

### 4.2.1 Mélange réactionnel

Le mélange réactionnel standard de la réaction de polymérisation en chaîne comprend les éléments suivants:

- 1- Tampon PCR 1X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,4, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 100µg/ml de gélatine).
- 2- 1µM de chaque amorce sens et antisens.
- 3- 0,2 mM des quatre déoxyribonucléotides dGTP, dATP, dTTP, dCTP, pH 7 (Pharmacia LKB Biotechnology).
- 4- 1µg d'ADN génomique humain isolé des lymphocytes d'individus normaux ou anémiques (tableaux 4 et 5).
- 5- 5 unités d'ADN polymérase thermostable.

Le volume est complété à 100µl avec de l'eau stérile pour irrigation, USP (Baxter Corporation, Toronto, Ontario). Quelque 70µl d'huile minérale, déposés à la surface du mélange, préviennent l'évaporation d'eau.

La concentration en ions divalents du milieu réactionnel, pouvant affecter la spécificité de l'hybridation des amorces, de même que l'activité et la fidélité de l'enzyme (Innis et Gelfand, 1990), différentes concentrations de MgCl<sub>2</sub> (5 à 40mM) ont été testées afin d'identifier les conditions d'amplification optimales. Même s'il réside une flexibilité remarquable dans la qualité de l'ADN nécessaire à l'amplification, la concentration de la matrice originale affecte cependant le processus

d'amplification de façon non négligeable. L'influence de ce facteur a également été investiguée.

L'utilisation massive du PCR a conduit à la commercialisation de nombreuses polymérases thermostables: Cetus Corporation (Montréal, Québec), Pharmacia LKB Biotechnology, Amersham et Stratagene (San Diego, CA). Nous avons évalué l'efficacité de ces différents enzymes.

#### **4.2.2 Automatisation**

Les variations cycliques de températures nécessaires à la réaction de polymérisation en chaîne ont été obtenues à l'aide de blocs thermiques programmables fournis par les compagnies Pharmacia LKB Biotechnology et Hypercell Biologicals (Chalk River, Ontario) Le tableau 7 présente les actions programmées pour une amplification standard à partir d'ADN génomique. Le dernier cycle comporte une étape de polymérisation plus longue afin de s'assurer que les fragments produits sont copiés sur toute leur longueur.

Pour la plupart des réactions en chaîne de la polymérase, les 40 cycles d'amplification décrits au tableau 7 ont été précédés d'une étape de chauffage. Cette procédure communément désignée "hot start", permet d'amorcer le PCR à température supérieure à la  $T_m$ , défavorisant les hybridations non spécifiques. Ainsi, le mélange réactionnel, dépourvu de son tampon PCR, est chauffé 2 minutes à 94°C. La composante manquante est rapidement ajoutée et les 40 cycles d'amplification immédiatement amorcés (tableau 7).

**TABLEAU 7. VARIATIONS DES TEMPERATURES UTILISEES LORS DES EXPERIENCES DE PCR STANDARD A PARTIR D'ADN GENOMIQUE LYMPHOCYTAIRE**

Cycle	Durée	Température
1 à 39	1 minute 1 minute 2 minutes	94°C $T_h^*$ 70°C
40	1 minute 1 minute 10 minutes  24 heures	94°C $T_h$ 70°C  4°C

\* Les températures d'hybridation ( $T_h$ ) varient selon les couples d'amorces utilisés (tableau 6)

### 4.2.3 Analyse des résultats et isolement des fragments produits par PCR

Les produits d'amplification sont caractérisés par électrophorèse. Une fraction du mélange réactionnel ( $\sim 10\mu\text{l}$ ) est chargée sur gel d'agarose NuSieve GTG 4% (FMC BioProducts, Rockland, ME) dans un tampon TAE (40mM Tris, 2mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , le pH est ajusté à 8 à l'aide d'acide acétique). La taille des fragments obtenus par PCR est évaluée par comparaison avec les bandes de tailles connues du marqueur de poids moléculaires  $\phi\text{X-174}$  digéré par HaeIII (Pharmacia LKB Biotechnology).

La récupération de l'ADN après séparation électrophorétique est une partie essentielle de la technologie requise pour la caractérisation ultérieure. Deux méthodes d'isolement de l'ADN ont été employées.

#### Isolement par interception sur DEAE-cellulose

Cette méthode est une adaptation de la technique décrite par Lisardi (1989) dans un article publié par la compagnie Schleicher & Schuell (Keene, NH).

Les réactions PCR ayant produit des fragments d'ADN de taille désirée sont d'abord débarrassés des sels qui les composent par ultrafiltration sur microconcentrateurs "Centricon" de porosité 30, selon les directives du fournisseur (Amicon, Oakville, Ontario). Le volume total recueilli est évaporé sous vide et le culot formé, resuspendu dans un volume de  $10\mu\text{l}$  d'eau stérile avant d'être soumis à une électrophorèse.

Un morceau de DEAE-cellulose (BioRad, Richmond, CA) coupé aux dimensions d'un puits, est inséré dans une incision pratiquée juste devant la bande d'intérêt. Pour

améliorer l'efficacité de liaison de l'ADN, les membranes sont préalablement lavées durant 10 minutes dans 10mM EDTA (pH 7,6), 5 minutes dans 0,5M NaOH et finalement rincées plusieurs fois avec de l'eau stérile.

L'électrophorèse est reprise jusqu'à ce que toute la bande soit interceptée par le papier tel que visualisé par fluorescence du bromure d'éthidium sous rayonnements UV. La membrane est libérée de l'agarose résiduel par un brassage vigoureux dans un tube contenant du tampon NET de faible force ionique (0,15M NaCl, 0,1mM EDTA, 20mM Tris, pH 8).

L'élution de l'ADN est réalisée à l'aide d'un tampon NET à force ionique élevée (1M NaCl, 0,1mM EDTA, 20mM Tris, pH 8). La membrane, submergée dans 200 $\mu$ l de la solution, est incubée 45 minutes à 68°C avec agitation occasionnelle. Pour assurer une efficacité de récupération supérieure, il est préférable de répéter l'élution deux autres fois.

Comme précédemment, le volume final recueilli (600 $\mu$ l) est désalé sur microconcentrateurs "Centricon" et débarrassé de son solvant par évaporation sous vide.

#### Isolement et conservation dans l'agarose à faible point de fusion

La faible température de fusion ( $\leq 65^\circ\text{C}$ ) et la capacité de résolution fine (jusqu'à 8 paires de bases) de l'agarose NuSieve GTG confèrent à cette matrice des propriétés idéales pour le "processing" enzymatique des acides nucléiques (ligation, transformation, réamplification PCR, génération de sondes) directement dans l'agarose fondu. Pour plusieurs expériences, la bande d'intérêt a été excisée du gel

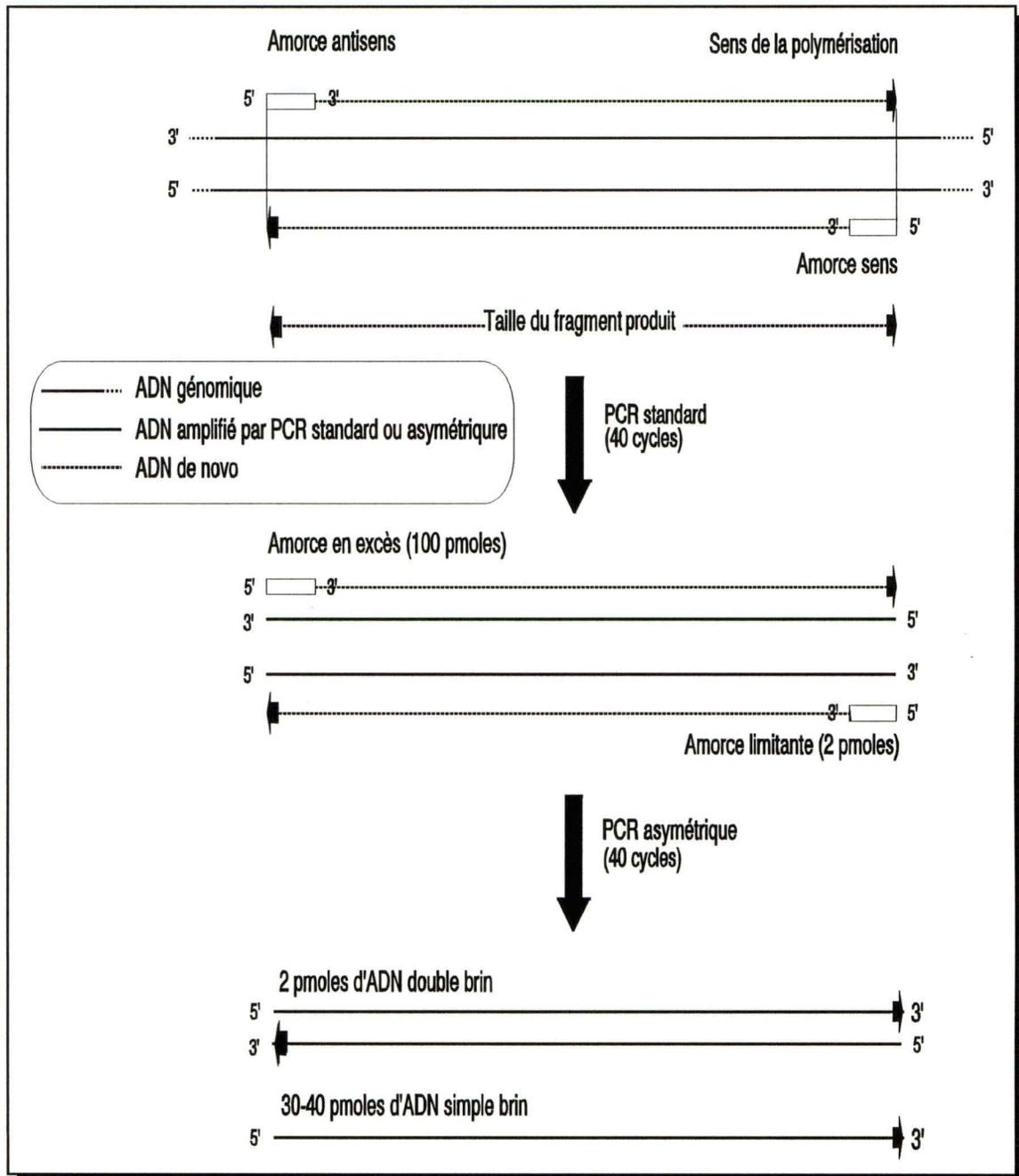
d'agarose est conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

### **4.3 PCR asymétrique**

La réaction en chaîne standard de la polymérase peut être modifiée de façon à générer des segments d'ADN spécifiques monobrins. La méthode utilisée, le PCR asymétrique (Gyllensten, 1989), tire son appellation du principe qu'elle sous-entend: un rapport inégal (asymétrique) des deux oligonucléotides est utilisé pour générer de l'ADN double brin pour les 20 à 25 premiers cycles et, lorsque l'amorce limitante est épuisée, de l'ADN monocaténaire pour les 15 à 20 cycles suivants. L'amplification asymétrique d'ADN génomique est problématique. Tel que proposé par Higuchi et al (1988), un protocole en 2 étapes, optimisé dans le laboratoire, a été utilisé (figure 6): 1- Génération de segments d'ADN double brin spécifiques par PCR standard, et séparation électrophorétique (§ 4.2); 2- Réamplification d'un aliquot d'ADN bicaténaire (~ 1ng) isolé par interception sur DEAE-cellulose ou directement prélevé d'une bande d'agarose NuSieve GTG refondue puis diluée dans un tampon TE à une concentration de 1ng/ $\mu$ l (§ 4.2.3).

Le mélange réactionnel optimisé pour l'amplification asymétrique diffère de celui proposé par Gyllensten (1989). Une variété de rapports asymétriques sont testés pour chaque nouveau couple d'amorces employé:

- 1- Tampon PCR 1X (§ 4.2.1).
- 2- 0,2 $\mu$ M des quatre déoxynucléotides (dGTP, dATP, dTTP, dCTP).
- 3- Rapports des amorces sens/antisens ou antisens/sens testés:



**FIGURE 6.** Aperçu de la procédure en deux étapes pour la génération d'ADN simple brin par PCR asymétrique. Une fraction des produits d'amplification bicaténaire engendrés par 40 cycles d'amplification standard, est soumise à un PCR asymétrique. Les concentrations des amorces ont initialement été ajustées à 100 pmoles et 2 pmoles, tel qu'indiqué. Après production d'environ 2 pmoles d'ADN double brin (20-25 premiers cycles), l'ADN monobrin commence à s'accumuler à un taux de 2 pmoles par cycle d'amplification (15-20 derniers cycles) (Gyllensten, 1989).

100 pmoles/0pmole; 100pmoles/2pmoles; 100pmoles/4pmoles; 100pmoles/6pmoles.

4- 1ng d'ADN double brin préamplifié par PCR standard.

5- 5 unités d'ADN polymérase thermostable.

Après 40 cycles d'amplification, tel que décrit précédemment (§ 4.2.3), l'ADN est facilement détectable sur gel d'agarose NuSieve GTG 4%. Il est cependant difficile à quantifier de façon consistante par coloration au bromure d'éthidium puisque sa tendance à former des structures secondaires et à intercaler le colorant peut varier largement d'un échantillon à l'autre (Gyllensten, 1989). L'évaluation de la concentration de l'ADN simple brin demeure souvent approximative.

## **4.4 RT-PCR**

L'amplification abondante atteinte par la technologie du PCR a contribué au développement d'une méthode désignée RT-PCR ("Rreverse transcriptase- polymerase chain reaction). La technique, également nommée MAPPING ("Message amplification phenotyping") (Larrick, 1992) ou encore cDNA-PCR (Chelly et al, 1990), inclut une procédure d'isolement d'ARNm ou d'ARN total (§ 3.2, § 3.3), une transcription inverse des ARN messagers ou totaux en ADNc, et une amplification enzymatique par PCR de fragments d'ADN cibles à partir des ADN complémentaires.

### **4.4.1 Transcription inverse**

Trois méthodes de transcription inverse ont été adaptées des techniques proposées par Frohman et al (1988), Chelly et al (1989) et Tse et Forget (1990).

La première utilise la transcriptase inverse (RT) isolée du *Avian myeloblastosis*

*virus* (AMV). Un microgramme d'ARN polyadénylé (ARN poly (A)<sup>+</sup>) ou 5 µg d'ARN total isolés d'un foie foetal ou d'un culot lymphocytaire, ont été dilués dans l'eau stérile, dénaturés à 65°C pendant 5 minutes, refroidis brutalement sur glace et ajoutés à 2µl d'un tampon RT 10X (500mM Tris-HCl pH 8,15 à 41°C, 60mM MgCl<sub>2</sub>, 400mM KCl, 10mM dithiothréitol, chaque dNTP à 15mM), 1µl BSA 1mg/ml, 0,67µl (10 unités) de RNasine (Promega Biotec, madison, WI) 1,05µl pd(T)<sub>12-18</sub> (0,48µg/µl) (Pharmacia LKB Biotechnology) ou 1µl de l'amorce PKLS11E 10pmoles/µl (tableau 6) et 100 unités de transcriptase inverse AMV (Pharmacia LKB Biotechnology). Afin de permettre la synthèse d'un premier brin d'ADNc, le mélange, complété à 20 µl, a été successivement incubé à 42°C puis 52°C pendant 90 minutes et 30 minutes, respectivement. Après l'incubation, il est essentiel d'inhiber la RT par chauffage (5 minutes à 95°C) en raison du pouvoir inhibiteur de l'enzyme sur l'activité de la Taq polymérase utilisée subséquentement (Sellner et al, 1992).

Le duplex ARN-ADNc généré est soumis à un traitement alcalin (3µl NaOH 5N, 2,6µl EDTA 0,5M avec incubation à 65°C pendant 10 minutes) afin d'amener l'hydrolyse du brin d'ARN. La solution est neutralisée par addition d'un même volume d'acide chlorhydrique 5N. Une filtration du mélange à l'aide d'un tube microconcentrateur "Centricon" assure l'élimination des sels, nucléotides et amorces en excès pouvant interférer lors d'une amplification PCR ultérieure. Le filtrat est évaporé et repris dans 10µl d'eau stérile..

La seconde méthode de transcription inverse utilise la RT du *Moloney murine leukemia virus* (MMuLV) (Pharmacia LKB Biotechnology). La dénaturation des

acides ribonucléiques s'accomplit par incubation de 1 $\mu$ g d'ARN poly (A)<sup>+</sup> ou 5 $\mu$ g d'ARN total à 95°C pendant 5 minutes, puis 30 secondes sur glace dans 3 $\mu$ l d'un tampon 50mM Tris-HCl pH 8,3 à 37°C contenant 8mM MgCl<sub>2</sub>, 30mM KCl, 10mM dithiothréitol, 15 unités RNasine et 1,05 $\mu$ l de poly d(T)<sub>12-18</sub> (0,48 $\mu$ g/ $\mu$ l) ou 5 $\mu$ l de l'oligonucléotide PKLA11E 10pmoles/ $\mu$ l (tableau 6). Un refroidissement rapide sur glace suit immédiatement l'incubation à 95°C. Le premier brin d'ADNc est synthétisé par extension d'amorces en présence de 100 unités de MMuLV-RT, à 37°C pendant 1 heure, puis 1 heure à 42°C dans un mélange total de 30 $\mu$ l auquel ont été ajoutés 2,5mM de chaque dNTP, 10 unités de RNasine, 50 $\mu$ g/ml BSA et 1mM pyrophosphate de sodium. Comme précédemment, le traitement alcalin, la neutralisation et l'ultrafiltration suivent l'incubation à 42°C.

La dernière procédure de transcription inverse expérimentée fait appel à la capacité de la polymérase Taq à transcrire directement les matrices d'ARN in vitro. Tel que décrit à la section suivante (§ 4.4.2), un protocole en une seule étape a été testé pour l'amplification des transcrits d'ARN.

#### **4.4.2 Amplification par PCR**

L'étape d'amplification du RT-PCR procède à partir de l'ADNc généré par transcription inverse d'acides ribonucléiques (Chelly et al, 1989) ou directement à partir des ARN messagers ou totaux (Tse et Forget, 1990).

Les premières composantes de chaque réaction d'amplification sont réunies: 4ng d'ARN total ou 1 $\mu$ g d'ARNm ou 1 $\mu$ l d'ADNc (§ 4.4.1), et 1X tampon PCR (§ 4.2.1), dans un volume total de 100 $\mu$ l. Avant l'addition des 5 unités de polymérase Taq,

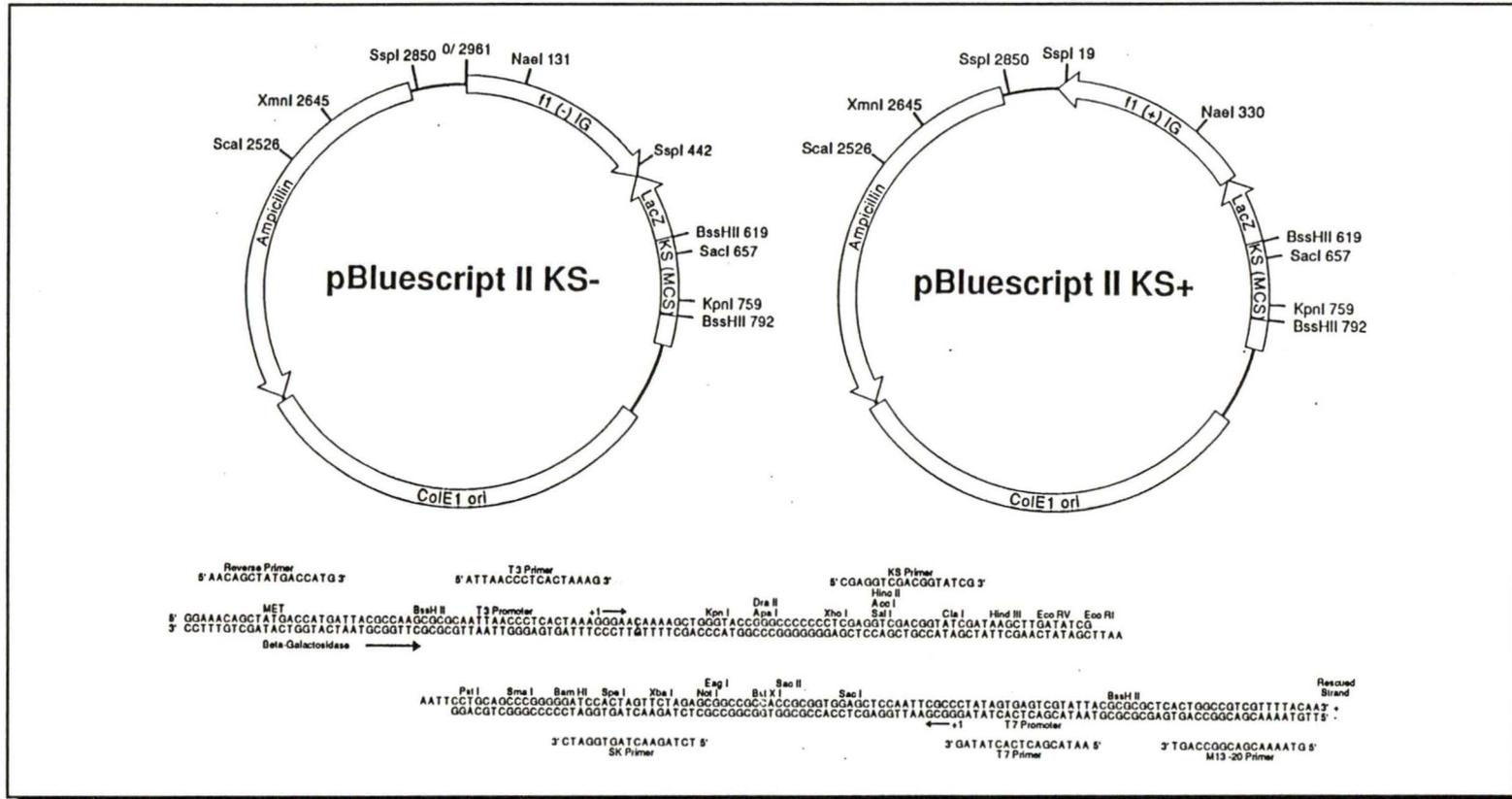
0,2mM dNTP et 1 $\mu$ M de chacune des amorces du couple choisi, 10 $\mu$ l de l'agent dénaturant DMSO (10% (v/v)) sont ajoutés et le mélange chauffé 5 minutes à 94°C afin d'assurer la déstabilisation des structures secondaires des différentes matrices. Les réactions complétées sont incubées dans un bloc thermique conformément à la procédure suivante: un premier cycle d'une minute à 95°C, 5 minutes à  $T_h$ , et 40 minutes à 70°C pour permettre la transcription du premier brin d'ADNc des matrices d'ARN et du deuxième brin des matrices d'ADNc, puis 40 cycles d'amplification d'une minute à 95°C, 1 minute à  $T_h$  et 2 minutes à 70°C. Une polymérisation de 10 minutes au 40<sup>e</sup> cycle assure la réplication complète des fragments amplifiés. Comme décrit antérieurement, la qualité de l'amplification est évaluée sur gel d'agarose après coloration au bromure d'éthidium.

D'autres conditions ont également été testées telles l'absence de DMSO, de même que l'omission des étapes de chauffage (5 minutes à 94°C) et d'extension prolongée (40 minute à 70°C).

## **5. Clonage**

### **5.1 Préparation du vecteur de clonage**

Le phagemide pBluescript II KS<sup>+</sup> (Stratagene) dérivé du plasmide pUC et du phage filamenteux M13, a servi au clonage des fragments d'ADN amplifiés par réaction en chaîne de la polymérase. Les vecteurs de clonage pBluescript II KS<sup>+</sup> contiennent (figure 7): 1-un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des cellules transformées; 2- une région intergénique f1 de 454 nucléotides d'un phage



**FIGURE 7.** Carte de restriction des phagemides pBluescript II KS+ et KS-. Les vecteurs combinent certaines caractéristiques du plasmide pUC et du phage filamenteux M13. Entre les promoteurs T3 et T7 insérés dans la région N-terminale du gène LacZ, 21 sites de restriction favorables au clonage ont été introduits. Les cellules transformées sont identifiées selon un mode de sélection double: la résistance à l'ampicilline conférée par la présence du vecteur pBluescript II KS+ et la formation de colonies par perte d' $\alpha$ -complémentation. Les vecteurs pBluescript II KS+ sont disponibles avec deux orientations du site de clonage multiple (KS ou SK) et de la région intergénique f1 (+ ou -).

filamenteux permettant la libération d'ADN plasmidique monobrin des cellules hôtes infectées par un bactériophage filamenteux approprié ("helper phage"); 3- une origine de réplication ColE1 du bactériophage M13; et 4- une portion de l'opéron lactose d'*E. coli* incluant l'opérateur, le promoteur et les 146 acides aminés N-terminaux de la  $\beta$ -galactosidase (peptide  $\alpha$ ) codée par le gène LacZ. Vingt et un sites de restriction uniques ("polylinker") favorables au clonage ont été insérés dans ce fragment du gène LacZ.

La portion aminoterminal de la  $\beta$ -galactosidase synthétisée dans les cellules transformées est capable de compléter (par  $\alpha$ -complémentation) un gène déficient pour la  $\beta$ -galactosidase (mutation lacZ $\Delta$ M15) présent sur l'épisome F' des cellules-hôtes utilisées, une souche *E. coli* XL-1 Blue recA<sup>-</sup> développée chez Stratagene (Bullock et al, 1987). Cette complémentation produit une  $\beta$ -galactosidase active qui peut être détectée par la présence d'une coloration bleue lorsque les cellules bactériennes transformées sont mises à pousser en présence de l'inducteur isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) et du substrat chromogénique 5-bromo-4-chloro-3-indoyle- $\beta$ -D-galactoside (X-gal). En effet, la  $\beta$ -galactosidase active dégrade le X-gal incolore en galactose et en 5-bromo-4-chloroindigo, une substance de couleur bleue. L'insertion d'un fragment d'ADN exogène au site de clonage multiple inactive le produit du gène et empêche l' $\alpha$ -complémentation. De cette façon, il est possible de reconnaître la présence des phagemides recombinants par l'absence de coloration bleue en présence de l'indicateur X-gal et de l'inducteur IPTG.

Le vecteur de clonage pBluescript II KS<sup>+</sup> est préparé par digestion avec l'enzyme

de restriction SmaI (Pharmacia LKB Biotechnology) dans un tampon "one phor all" 1X (10mM Tris-acétate (pH 7,5), 10mM acétate de magnésium, 50mM acétate de potassium). Dans un volume total de 10 $\mu$ l , deux microgrammes du phagemide pBluescript II KS<sup>+</sup> sont digérés 5 heures à température du laboratoire en présence de 2 unités d'enzyme. Les extrémités franches, issues de la digestion SmaI, facilitent les étapes subséquentes du clonage. L'efficacité de la digestion est vérifiée par l'électrophorèse sur gel d'agarose GTG 0,7% d'un échantillon de plasmide digéré.

## **5.2 Ligation**

Suivant la méthode d'isolement des fragments produits par PCR, deux stratégies de ligation ont été adoptées.

### **5.2.1 Ligation d'ADN isolé par interception sur DEAE-cellulose**

Les conditions expérimentales utilisées sont celles décrites par Ausubel et al (1989). La ligation d'extrémités franches se fait idéalement avec un rapport molaire d'insert:vecteur de 5:1, en présence de faibles concentrations (0,5mM d'ATP) (Ferretti et Sgaramella, 1981) et en ajoutant un nombre élevé d'unités (5 unités) d'ADN ligase T4 dans un volume final de 10 $\mu$ l (Sambrook et al, 1989b).

Dans une proportion adéquate (5:1), l'insert et le vecteur linéarisé par l'enzyme SmaI (§ 5.1) sont mélangés puis incubés à 65°C pendant 20 minutes, de façon à supprimer les structures secondaires des ADN. La réaction de ligation se poursuit 16 heures à température normale dans un tampon "one phor all plus" 1X (10mM Tris-acétate, 10mM acétate de magnésium et 50mM acétate de potassium), en présence

de 0,5mM ATP (Pharmacia LKB Biotechnology), 10mM dithiothréitol et 5 unités d'ADN ligase T4 (Pharmacia LKB Biotechnology). Un chauffage de 10 minutes à 65°C ou l'addition de 12,5mM EDTA arrêtent la réaction en inhibant l'activité enzymatique de l'ADN ligase T4.

Il est également essentiel de pouvoir vérifier l'efficacité de la ligation en incluant une réaction contrôle dans laquelle le volume d'insert est remplacé par un volume équivalent d'eau stérile.

### **5.2.2 Ligation d'ADN conservé dans l'agarose à faible point de fusion**

L'ADN conservé dans une bande d'agarose NuSieve GTG 4% est ligué au vecteur pBluescript II KS<sup>+</sup> linéarisé comme décrit précédemment (§ 5.2.1), moyennant quelques particularités. Puisqu'au moins 10 $\mu$ l d'agarose 4% fondu à 68°C pendant 10 minutes sont généralement requis pour assurer le rapport insert/vecteur optimal, la réaction doit s'effectuer dans un volume plus important (>10 $\mu$ l). Un mélange final de 60 $\mu$ l assure une dilution suffisamment élevée de la matrice d'agarose pour éviter sa resolidification et empêcher une diminution de l'efficacité de transformation (§ 5.4) provoquée par des concentrations en agarose NuSieve GTG supérieures à 1,5% (FMC, 1988). De plus, l'ajout de 5 unités supplémentaires d'ADN ligase T4 a permis d'optimiser la méthode.

## **5.3 Préparation des cellules compétentes et transformation**

Lorsqu'un vecteur recombinant est formé, il devient nécessaire de l'établir comme élément répliatif dans une bactérie de façon à le maintenir. Les procédures

employées pour la préparation des cellules compétentes et leur transformation ont été adaptées des méthodes présentées par Hanahan (1983) et Stratagene (Stratagene Instruction Manual, 1991).

### 5.3.1 Matériel

Une souche d'*E coli* XL-Blue *recA*<sup>-</sup> a été sélectionnée pour la transformation. Elle présente un génotype *recA1*, *lac*<sup>-</sup>, *endA1*, *gyrA96*, *lambda*<sup>-</sup>, *thi-1*, *hsdR17* (*rk*<sup>-</sup>, *mk*<sup>+</sup>), *supE44*, *relA1*, F'({*proAB*, *lacIq*, *lacZΔM15*, Tn10 (*tet*<sup>R</sup>)}). Le gène *LacZΔM15*, nécessaire à l' $\alpha$ -complémentation et ainsi à la sélection des recombinants, est porté par l'épisome F' des bactéries. En dépit de l'absence d'ADN exogène inséré au site de clonage multiple du phagemide pBluescript II KS<sup>+</sup>, les cellules hôtes ayant perdu leur facteur F' formeront des colonies blanches sur plats de pétris X-gal, IPTG, conduisant au faux diagnostic d'un recombinant positif. Cependant, l'épisome F' des bactéries XL-1 étant aussi porteur d'un marqueur sélectif de nutrition (gène *proAB*) nécessaire à la biosynthèse endogène de la proline, seules les cellules ayant conservé leur épisome pourront croître sur un milieu minimum et ainsi être sélectionnées. L'ajout de tétracycline aux milieux de culture permet aussi de sélectionner les cellules porteuses d'épisome, celles-ci ayant un gène de résistance à cet antibiotique.

Des tampons et milieux de culture variés ont servi à la préparation des cellules compétentes et à leur transformation. Sauf contre-indication, leur composition est donnée par litre de solution (tableau 8).

**TABLEAU 8. COMPOSITION DES TAMPONS ET MILIEUX DE CULTURE UTILISES POUR LA PREPARATION DES CELLULES COMPETENTES ET LEUR TRANSFORMATION**

Milieu	Composition*
Milieu B	10g bactotryptone, 0,14M NaCl, 0,001% vitamine B <sub>1</sub> (thiamine). Le milieu B solide contient, en plus, 20g d'agar Difco (Détroit, MI).
SOB	20g bactotryptone, 5g extrait de levure, 15mM NaCl, 2mM KCl et 10ml d'une solution 2M Mg (1M MgCl <sub>2</sub> , 1M MgSO <sub>4</sub> ) sont ajoutés au milieu après sa stérilisation dans une autoclave.
2 YT	16g bactotryptone, 10g extrait de levure, 0,171M NaCl.
SOC	SOB contenant 1% (v/v) de glucose 2M.
FSB	10mM acétate de potassium, 45mM MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O.
Milieu minimum	1mM MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0,2% glucose et 100ml "M9 salts" (0,42M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,22M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 85mM NaCl, 0,19mM NH <sub>4</sub> Cl).

\* Lorsque mentionné dans les protocoles, les antibiotiques ampicilline (50µg/µl) et tétracycline (12,5µg/ml) sont ajoutés aux milieux refroidis après leur stérilisation dans une autoclave.

### 5.3.2 Préparation des cellules compétentes

Les cellules XL-1 Blue *recA*<sup>-</sup> conservées congelées dans un milieu 2 YT glycérolé(30%) sont étalées sur gélose minimum. Une colonie est prélevée et mise à pousser sous agitation (12 heures) dans 10ml de milieu SOB à 37°C, en présence de tétracycline. Une fraction de la culture (0,5ml) sert à ensemercer un volume de 35ml de milieu SOB placé à 37°C jusqu'à l'obtention d'un niveau de turbidité adéquat ( $DO_{550} = 0,40$  à  $0,45$ ). Les cellules refroidies sont récoltées par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 minutes et resuspendues dans le tiers du volume initial, avec du FSB froid. Un refroidissement des bactéries doit précéder une seconde centrifugation (4000 rpm, 5 minutes). La solution froide de FSB est utilisée pour reprendre le culot dans 1/12 du volume initial. Les bactéries sont mises en présence de DMSO en deux étapes successives jusqu'à des concentrations finales de 3,5% (v/v) puis 7% (v/v). Les cellules XL-1 Blue *recA*<sup>-</sup> devenues compétentes, sont séparées en aliquots de 600  $\mu$ l et conservées à -80°C jusqu'à utilisation ou pour une durée maximale de 6 mois.

### 5.3.3 Transformation

La procédure de transformation est la même pour l'ADN ligué en solution (§ 5.2.1) ou dans l'agarose (§ 5.2.2). Environ 10ng d'ADN issus des expériences de ligation servent à transformer 200 $\mu$ l de cellules XL-1 Blue *recA*<sup>-</sup> compétentes. Des quantités équivalentes du phagemide pBluescript II KS<sup>+</sup> non digéré puis reliqué en absence d'ADN exogène (§ 5.2) sont utilisées pour la transformation du même volume de bactéries compétentes. Ces contrôles permettent d'évaluer l'efficacité de la transformation qui se calcule en fonction du nombre de cellules transformées

(colonies produites) par microgramme d'ADN utilisé pour la transformation.

Aux cellules compétentes décongelées lentement sur glace, sont ajoutés 20 $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol 250mM afin d'améliorer l'efficacité de la transformation. Les bactéries sont incubées 10 minutes à 4°C avec agitation occasionnelle puis mélangées à l'ADN. Un choc thermique de 45 secondes à 42°C facilite l'entrée du matériel génétique à l'intérieur des cellules traitées. Les tubes sont placés à 37°C avec agitation (225 rpm) durant une heure après l'addition d'un volume de 800 $\mu$ l de milieu SOC.

A la fin de la période d'incubation, une partie des cellules (200 à 600 $\mu$ l) est immédiatement étalée sur gélose B, avec ampicilline (50 $\mu$ g/ml), tétracycline (12,5 $\mu$ g/ml), X-gal (80 $\mu$ g/ml) et IPTG (20mM). Le développement de la coloration bleue prend généralement 18 heures à 37°C. Une incubation subséquente de quelques heures à 4°C permet d'accélérer le processus d'apparition de la coloration.

## **5.4 Sélection et amplification des clones recombinants**

Les recombinants doivent être sélectionnés sur un bruit de fond souvent important de faux positifs. Une méthode rapide de criblage, la micropréparation d'ADN, a été proposée par Stratagene (Stratagene Instruction Manual, 1991). Des minipréparations d'ADN (Sambrook et al, 1989c) ont produit des quantités d'ADN plus appréciables et d'une meilleure qualité requises notamment pour la séquençage d'ADN (§ 6). Enfin la méthode désignée "grosse préparation d'ADN" (§ 5.4.3) (Sambrook et al, 1989d) permet d'amplifier davantage les recombinants sélectionnés. Les quantités d'ADN ont permis la génération de plusieurs sondes (§ 7.3).

### 5.4.1 Micropréparation d'ADN

Le criblage des recombinants s'effectue sur milieu B solide avec ampicilline, tétracycline, X-gal et IPTG. Plusieurs colonies candidates, résultant des expériences de transformation, sont striées sur une ligne à l'aide de cure-dents stériles. Les plats de Pétri sont incubés à 37°C toute la nuit. Une portion des bactéries est récoltée et leur matériel génétique libéré par resuspension des cellules dans un tampon STE (100mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH7,5, 10mM EDTA) et extraction au phénol/chloroforme. La dégradation de l'ARN procède rapidement en présence d'un microgramme de ribonucléase. La taille des clones est comparée à celles de vecteurs sauvages (sans insert) par électrophorèse sur gel d'agarose GTG 0,7%.

Dans certains cas, les phagemides de taille supérieure au vecteur sauvage ont été traités par des enzymes de restriction afin de certifier la longueur attendue du fragment d'ADN inséré. Une double digestion des recombinants ( $\sim 2\mu\text{g}$  d'ADN digérés 4 heures à 50°C dans un tampon "one phor all") avec les enzymes HindIII (5 unités) et BamHI (5 unités) a rendu possible l'estimation de la taille de la plupart des inserts. L'enzyme PvuII (5 unités) a été utilisé dans les autres cas. L'absence de sites de restriction HindIII, BamHI ou PvuII dans les séquences clonées, a été confirmée par analyse informatique utilisant le logiciel "Pustell Sequence Analysis Programs" conçu par la firme International Biotechnologies, Inc. (New Haven, CT).

### 5.4.2 Minipréparation d'ADN par lyse alcaline

Les recombinants identifiés par micropréparation d'ADN sont mis à pousser

dans un faible volume (~3ml) de milieu 2 YT en présence d'ampicilline 100 $\mu$ g/ml. Une centrifugation à 4°C pendant 2 minutes entasse les bactéries transformées en un culot qu'on resuspend dans 100 $\mu$ l d'une solution TEG froide (50mM glucose, 10mM EDTA et 25mM Tris-HCl pH 8). Le mélange est conservé 5 minutes à température de la pièce et la lyse des cellules provoquée par l'ajout de 200 $\mu$ l d'une solution fraîche NaOH/SDS (0,2N NaOH, 1% SDS). L'addition subséquente de 150 $\mu$ l d'acétate de potassium (3M KOAc, 2M HOAc pH 5,5) amène la précipitation de l'ADN chromosomique, des débris cellulaires et du SDS potassique. Le matériel non désiré est éliminé par centrifugation et le surnageant débarrassé de sa composante protéique par extraction phénol/chloroforme. On élimine toutes traces de phénol par une dernière extraction au chloroforme. Les acides nucléiques sont précipités 1 heure à -20°C en présence de 2 volumes d'EtOH. Le culot récupéré par centrifugation est repris dans 1ml d'EtOH 70% afin de supprimer les sels présents. Les acides nucléiques sont resuspendus dans 50 $\mu$ l de tampon TE et l'ARN éliminé par traitement à la RNase pancréatique bovine. La migration électrophorétique sur gel d'agarose 0,7% permet d'évaluer le rendement des préparations d'ADN recombinant.

### **5.4.3 Grosse préparation d'ADN par lyse alcaline**

Des volumes de culture initialement plus importants (1 litre) sont utilisés pour les grosses préparations d'ADN. Le principe de la technique est identique à celui décrit pour la minipréparation d'ADN.

## 5.5 Conservation des clones

Les cellules XL-1 Blue recA<sup>-</sup> transformées peuvent être conservées plusieurs années à -20°C dans un milieu 2 YT glycérolé à 30%. Un millilitre de glycérol est ajouté à 2 ml d'une culture en phase stationnaire. Les cellules sont laissées 30 minutes à température ambiante afin d'assurer leur équilibration osmotique, puis congelées à -20°C.

## 6. Séquençage

Les séquences des fragments d'ADN générés par PCR ont été déterminées après clonage moléculaire dans pBluescript II KS<sup>+</sup> ou par séquençage direct des matrices d'ADN bicaténaires ou monobrins. La procédure employée dérive de la méthode des terminateurs de chaînes initialement décrite par Sanger et al (1977). Elle met à profit la propriété des didéoxynucléotides, dépourvus d'hydroxyls 3' sur le ribose, d'agir, après incorporation, comme inhibiteurs spécifiques de l'élongation de la chaîne d'ADN nouvellement synthétisée.

### 6.1 Séquençage des fragments d'ADN clonés dans pBluescript

Les vecteurs recombinants sélectionnés par micropréparations d'ADN ont été séquencés dans leur forme double chaîne selon deux procédures: la première, décrite par Pharmacia LKB Biotechnology, utilise l'ADN polymérase T7; la seconde, présentée par Promega Corporation (Madison, WI), tire profit des propriétés intrinsèques de l'ADN polymérase isolée de *Thermus aquaticus* (ADN polymérase Taq). Deux configurations de mélanges nucléotidiques ont été employées. En plus des

nucléotides réguliers (Pharmacia LKB Biotechnology Instructions, New Revised Edition), un mélange de déazanucléotides, substituant le 7-déaza dGTP pour le dGTP, a été utilisé afin de résoudre les compressions des bandes associées aux régions d'ADN riches en bases guanines et cytosines (Pharmacia LKB Biotechnology Instructions, 1990a; Promega Technical Manual, 1988). Avec l'ADN polymérase Taq, un protocole avec marquage préalable de l'extrémité 5' des amorces a été préféré au protocole utilisé avec l'ADN polymérase T7 où les chaînes d'ADN sont marquées en cours d'extension. L'isotope [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Amersham, Oakville, Ontario) a servi au marquage des oligonucléotides, tel que décrit par Promega Corporation. Le marquage des chaînes d'ADN en extension a nécessité l'utilisation de l'un ou l'autre des isotopes [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP ou [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (Amersham).

## **6.2 Séquençage direct**

Le séquençage direct (sans clonage) d'ADN bicaténaire ou simple chaîne respectivement générés par PCR standard (§ 4.2) ou asymétrique (§ 4.3) nécessite la purification et la concentration préalables des acides nucléiques par filtration sur microconcentrateurs "Centricon 30" (§ 4.2.3) (Gyllensten et Erlich, 1988). Une centrifugation finale de 30 minutes des tubes Centricon permet de recueillir l'ADN dans un volume total approximatif de 50 $\mu$ l. Un cinquième (1/5) de la solution suffit au séquençage d'ADN monobrin; le volume complet, réduit par évaporation sous vide, est toutefois requis dans le cas d'ADN bicaténaire.

Outre l'étape préliminaire de dénaturation à la chaleur nécessaire avec l'ADN

double chaîne, le séquençage des deux types d'ADN suit les mêmes étapes, tel que décrit par Pharmacia LKB Biotechnology et Promega Corporation. Les réactions de séquence ont été amorcées en utilisant l'un ou l'autre des oligonucléotides de synthèse employés pour l'amplification par PCR du fragment d'ADN correspondant. Seules les amorces purifiées ont servi au séquençage (§ 4.1.2).

Un certain nombre de modifications à la procédure présentée par les fabricants ont également été expérimentées. Tel que proposé par Winship (1989), l'agent dénaturant diméthylsulfoxyde (DMSO) a été inclus à l'étape d'hybridation des amorces à une concentration de 10%. De même, les temps de marquage et de terminaison ont été réduits de 5 à 2 minutes.

### **6.3 Analyse des séquences**

L'accès à la banque de données "GenBank" et l'utilisation du logiciel "Pustell Sequence Analysis Program" ont facilité l'analyse des séquences nucléotidiques obtenues. Dans certains cas, les séquences ont été traduites en acides aminés, l'emplacement des sites de restriction identifié, et des homologies de séquences observées. Le logiciel "Prosis" a également permis l'obtention de graphiques d'hydrophobicité à partir de séquences en acides aminés déduites des séquences nucléotidiques.

## **7. Analyse par "Southern blots"**

Les techniques de transfert décrites par Southern (1975) ont permis la localisation de séquences particulières à partir d'ADN génomique lymphocytaire.

## **7.1 Préparation des échantillons et migration électrophorétique**

Des quantités variables (1 à 5 $\mu$ g) d'ADN génomique isolé des lymphocytes d'individus normaux ou anémiques (tableau 4), ont été digérées dans un tampon "one phor all", en présence de 40mM spermidine et 20 unités de l'un ou l'autre des enzymes de restriction HindIII (Pharmacia LKB Biotechnology), EcoRI (Pharmacia LKB Biotechnology) ou PstI (Amersham). Les réactions sont incubées pour une durée de 2 heures à 37°C avec les enzymes EcoRI et PstI, ou à 50°C avec HindIII. Après l'ajout de 20 unités supplémentaires d'enzymes, les échantillons sont remis à 37°C ou 50°C pour une deuxième période d'incubation équivalente.

L'ADN génomique digéré est fractionné sur gel d'agarose 0,7% avant son transfert sur membrane de nylon. Des concentrations en agarose supérieures à 1,5% rendent impraticables le transfert ultérieur du matériel génétique.

## **7.2 Transfert de l'ADN sur filtre de nylon**

A température du laboratoire, le gel d'agarose est soumis à un traitement alcalin (5N NaOH, 5M NaCl) pendant 30 minutes afin d'assurer la dénaturation du matériel génétique, puis neutralisé dans les mêmes conditions en présence de 1,5M Tris-HCl (pH 7,5) et 3M NaCl. Une membrane DEAE-nylon (ZetaProbe de BioRad) découpée aux dimensions du gel, est imbibée d'eau stérile puis trempée dans un tampon phosphate pH 6,5 (8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Le gel d'agarose traité est déposé sur 5 feuilles de papier absorbant Whatman 3MM, dont trois d'entre elles ont leurs extrémités plongées dans une solution

phosphate pH 6,5. Le filtre est déposé sur le gel encadré de membranes parafilm puis recouvert de 3 feuilles de papier Whatman 3MM imbibées de tampon phosphate pH 6,5. Celles-ci sont surmontées de papier absorbant sec et d'un poids d'environ 200g en s'assurant de la répartition homogène de la pression. Le transfert s'effectue pendant la nuit à température ambiante. Son efficacité est confirmée sous rayonnements ultraviolets par une coloration du gel au bromure d'éthidium.

Après transfert, la membrane, rincée dans une solution SSC 2X (0,3M NaCl, 0,03M citrate de sodium), est cuite à 80°C pendant 60 minutes afin de mieux consolider l'ADN au filtre de nylon.

## **7.3 Génération des sondes**

### **7.3.1 Préparation des matrices pour le marquage**

Des fragments d'ADN amplifiés par PCR ont servi à la génération de sondes pour les analyses par buvardage de type "Southern". Les fragments clonés au site *Sma*I du pBluescript II KS<sup>+</sup> (§ 5) ou extraits du vecteur par digestion enzymatique (§ 5.4.1) ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose GTG 0,7% dans le premier cas; et 4%, dans le second. Tel que décrit respectivement aux sections 4.4.1 et 4.4.2, les matrices peuvent être extraites du gel par interception sur DEAE-cellulose ou directement conservées dans l'agarose à faible point de fusion.

### **7.3.2 Marquage**

Suivant le mode d'isolement des matrices, deux stratégies de marquage ont été employées. Le marquage d'ADN en solution est mené, selon les instructions du

fournisseur (Pharmacia LKB Biotechnology, 1990b) dans un volume final de 50 $\mu$ l d'une solution formée d'ADN dénaturé à la chaleur (25ng), d'un mélange d'hexa-déoxyribonucléotides couvrant une multitude de combinaison de séquences, des nucléotides dGTP, dATP, dTTP et [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (50 $\mu$ Ci) et d'un tampon d'action du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E coli* utilisé à une concentration de 5 unités. Le mélange réactionnel est incubé toute la nuit à 37°C.

Le marquage d'ADN isolé dans l'agarose comporte certaines étapes préparatoires supplémentaires. Initialement, la bande d'intérêt doit au moins contenir 250ng d'ADN. Trois millilitres d'eau sont ajoutés par gramme de gel et le mélange est chauffé à 65°C pendant 2 minutes afin d'assurer la dissolution de l'agarose. L'ADN d'une fraction de ce matériel (25 $\mu$ l) est dénaturé par incubations successives à 95°C (7 minutes) puis 37°C (10 minutes).

### **7.3.3 Purification des sondes**

Les sondes marquées en solution sont purifiées sur mini-colonne d'exclusion formées de Séphadex G-50 grossier (Pharmacia LKB Biotechnology) et équilibrées avec un tampon STE (10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA, 1M NaCl). Les sondes marquées dans l'agarose doivent être utilisées sans purification.

### **7.3.4 Détermination du pourcentage d'incorporation**

La proportion de précurseurs radioactifs incorporés lors du marquage des sondes a été mesurée par précipitation des acides nucléiques avec l'acide trichloroacétique (TCA), tel que décrit par Sambrook et al (1989e).

## 7.4 Préhybridation et hybridation

La membrane est placée dans un sac de polyéthylène et incubée 3 heures dans une solution bouillie formée de 10% sulfate de dextran, 1M NaCl, 1% SDS et 0,1mg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé (10 minutes à ébullition), à raison de 2ml de solution pour 10cm<sup>2</sup> de surface.

L'hybridation est réalisée dans un nouveau volume (0,5 à 1ml/cm<sup>2</sup>) de la même solution contenant la sonde radioactive (2X10<sup>6</sup> cpm/ml de milieu d'hybridation) préalablement dénaturée par ébullition pendant 10 minutes. L'ensemble est filtré sur Millipore (0,45µm) avant d'être mis en contact avec la membrane.

Après une hybridation de 18 heures à 65°C, le filtre est lavé à 65°C dans des milieux de stringences croissantes:

- 1- Deux incubations de 5 minutes à T.N. dans une solution 2XSSC.
- 2- Une incubation de 30 minutes à 65°C dans une solution 2XSSC + 1% SDS.
- 3- Une incubation de 30 minutes à 65°C dans une solution 0,1XSSC + 0,5% SDS.

Des conditions de stringence réduite ont également été obtenues en abaissant de 4°C les incubations à 65°C et en décuplant la concentration de sel utilisée au dernier lavage. A la fin des procédures de lavage, toutes traces de SDS ont été éliminées en agitant la membrane à température ambiante pendant 30 minutes dans une solution 0,1XSSC (haute stringence) ou 1XSSC (basse stringence).

Le filtre, conservé humide, est enfin placé dans une enveloppe de polyéthylène scellée et mis au contact d'un film X-OMAT RP (Eastman Kodak Company, Roches-

ter, NY) entre deux écrans intensificateurs à -80°C. Le temps d'exposition varie de 12 heures à quelques jours.

## **7.5 Déshybridation**

Le même filtre peut être hybridé à répétitions en utilisant des sondes variées. La procédure de déshybridation employée est celle présentée par le fournisseur Dupont (Dupont de Nemours E.I. & Co. (Inc.), 1985). La membrane est bouillie deux fois 20 minutes dans une solution 0,01% SDS et 0,01XSSC. L'efficacité de la déshybridation est contrôlée par autoradiographie.

## **8. Analyse par "Northern blots"**

### **8.1 Linéarisation de l'ARN total et électrophorèse**

Pour permettre la linéarisation des échantillons d'ARN totaux isolés de culots lymphocytaires (§ 3.2), on les porte à 50°C pendant 1 heure, en présence de 6M glyoxal déionisé, 50% (v/v) DMSO et 100mM phosphate de sodium pH 7. Les réactions sont brusquement refroidies sur glace puis chargées sur gel d'agarose stérilisé dans un tampon phosphate de sodium 10mM pH 7. L'électrophorèse horizontale a lieu dans le même tampon sous une tension de 30 à 40 volts avec recirculation de tampon afin d'éviter la formation d'un gradient de pH.

### **8.2 Transfert des ARN sur filtre de nylon**

Décrite à la section 7.2 pour le transfert d'ADN, la procédure de transfert par capillarité a également été utilisée pour les acides ribonucléiques. Une membrane de

nylon de type Gene Screen<sup>+</sup> (NEN Research Products, Boston, MA) a cependant été préférée aux filtres de DEAE-nylon utilisés pour les analyses par "Southern blots".

### **8.3 Préhybridation et hybridation**

Le filtre est placé dans un sac de polyéthylène hermétiquement scellé puis incubé 3 heures à 42°C dans un tampon 1M NaCl (1ml/10cm<sup>2</sup>) contenant 50% formamide, 5X Denhart's, 1% SDS, 0,2mg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé, et 10% sulfate de dextran. L'hybridation s'effectue à 42°C pendant 16 heures dans la même solution contenant 5ng/ml d'une sonde marquée au [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (§ 7.3).

Le filtre est lavé à haute stringence selon la procédure suivante:

- 1- Deux lavages de 20 minutes à T.N. dans une solution 2XSSC.
- 2- Deux lavages de 20 minutes à 50°C dans une solution 2XSSC + 1% SDS.
- 3- Deux lavages de 20 minutes à 50°C dans une solution 0,1XSSC + 1% SDS.

La membrane est conservée 2 à 3 jours à -80°C, au contact d'une pellicule Kodak X-OMAT RP.

# RESULTATS

---

## 1. Optimisation des conditions expérimentales

La conception de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est l'un des plus substantiels avancements techniques en génétique moléculaire, depuis la dernière décennie. L'automatisation de la méthode a favorisé le développement d'applications nombreuses et variées. Manifestement, un protocole unique ne peut satisfaire à toutes les situations et, en conséquence, chaque nouvelle application réclame son optimisation. Les difficultés les plus souvent encourues incluent (Innis et Gelfand, 1990): l'absence ou le faible rendement du produit désiré; la présence d'un ensemble de bandes non spécifiques résultant d'un mauvais appariement ou d'une mauvaise extension des amorces; la formation de dimères d'oligonucléotides pouvant compétitionner pour l'amplification avec le produit voulu; et les mutations introduites de façon aléatoire par la polymérase thermostable.

Ce chapitre présente les résultats issus du processus d'optimisation de la méthode d'amplification PCR en exposant d'abord les paramètres ayant permis d'influencer sa spécificité et son rendement. Trois applications de la technique, le PCR asymétrique, le RT-PCR et le séquençage de produits PCR, ont également requis l'optimisation de leurs conditions expérimentales.

## **1.1 Spécificité et rendement du PCR**

### **1.1.1 PCR et contamination**

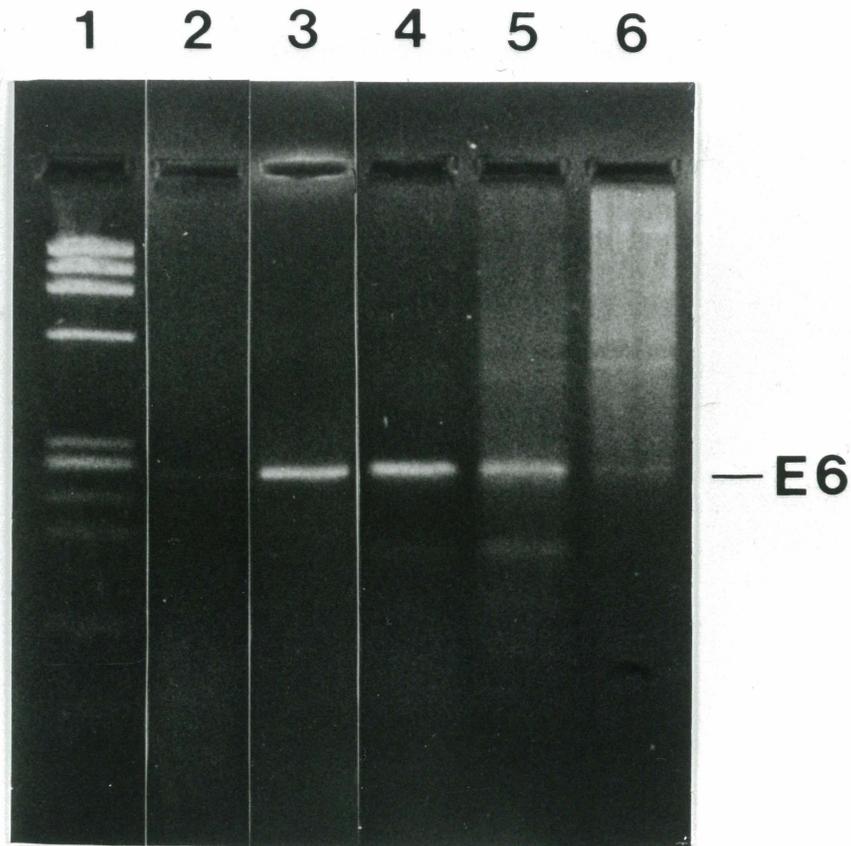
La sensibilité extrême du PCR doit être appréciée dans le contexte de sa susceptibilité équivalente à la contamination. Plusieurs auteurs ont soulevé l'importance du phénomène, investigué ses possibles origines et proposé des moyens de l'enrayer (Lo et al, 1988; Kwok et Higuchi, 1988; Sarkar et Sommer, 1990).

L'influence des molécules d'ADN contaminantes sur la spécificité et le rendement des amplifications PCR a été envisagée. Les vérifications effectuées à quelques reprises révélaient l'absence de contamination. Aucun produit n'a été détecté en soumettant des mélanges réactionnels complets sans ADN, à 40 cycles d'amplification. De même, l'irradiation préalable des solutions aux rayonnements ultra-violets (254nm) ne modifie aucunement la spécificité et le rendement des réactions d'amplification.

### **1.1.2 Effet des variations de concentrations en $MgCl_2$**

Il est bénéfique d'optimiser la concentration en ions magnésium. Celle-ci affecte de nombreux facteurs (Innis et Gelfand, 1990): l'hybridation des amorces, les températures de dissociation des matrices initiales et des produits PCR, la spécificité de la réaction, la formation de dimères d'amorces, l'activité et la fidélité de l'enzyme.

Plusieurs concentrations en  $MgCl_2$  ont été testées. Comme l'indique la figure 8, des concentrations optimales en  $MgCl_2$  de 10mM et 15mM sont obtenues pour l'amplification de l'exon 6 du gène PK-L. L'amplification d'autres portions du gène



**FIGURE 8.** Effet des variations de concentrations en  $MgCl_2$  sur l'efficacité des réactions PCR. Un microgramme d'ADN génomique lymphocytaire a été soumis à 40 cycles d'amplification en présence de  $1\mu M$  de chacune des amorces PKLS6 et PKLA6,  $0,2\mu M$  dNTP, 5U de polymérase Taq, 1X tampon PCR standard dont la concentration en  $MgCl_2$  variait: 5mM (piste 2), 10mM (piste 3), 15mM (piste 4), 25mM (piste 5), 40mM (piste 6). Chaque échantillon ( $10\mu l$ ) a été résolu sur gel d'agarose NuSieve GTG 4% et visualisé par fluorescence au bromure d'éthidium. La piste 1 contient 500ng du marqueur de poids moléculaires  $\phi X-174$  RF HaeIII. La position du fragment correspondant à l'exon 6 du gène PK-L est désignée par l'abréviation E6.

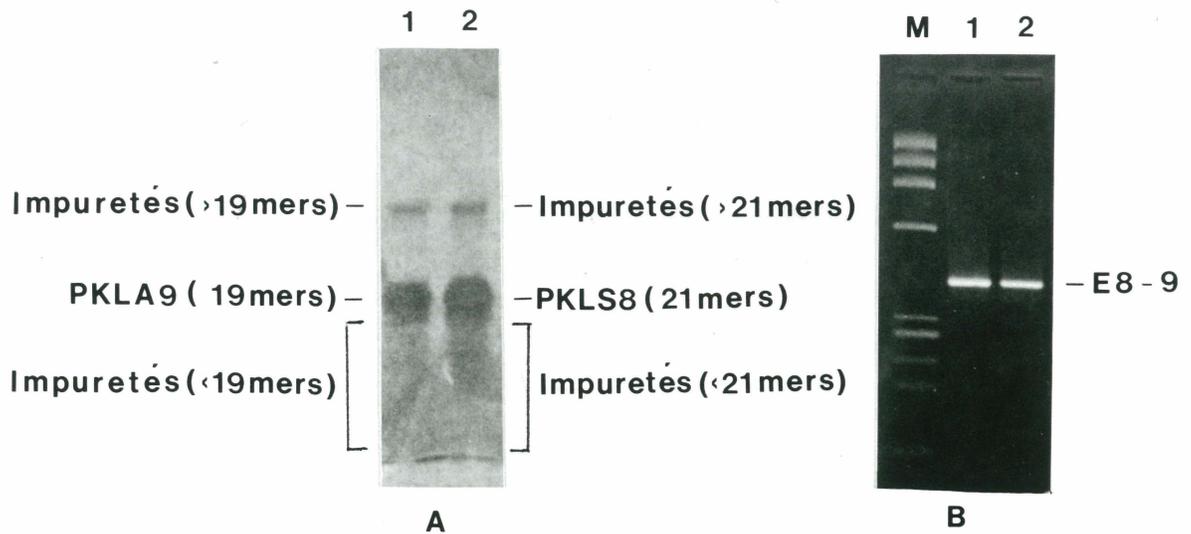
ou du génome est également favorisée à ces concentrations. Généralement, un excès (>15mM) d'ions  $Mg^{+2}$  résulte en l'accumulation de produits non spécifiques (piste 5, figure 8), entraînant, à l'extrême, un bruit de fond important (piste 6, figure 8). Au contraire, une quantité insuffisante (<10mM) de magnésium réduit le rendement de la réaction (piste 2, figure 8).

### **1.1.3 Spécificité, rendement et purification des amorces**

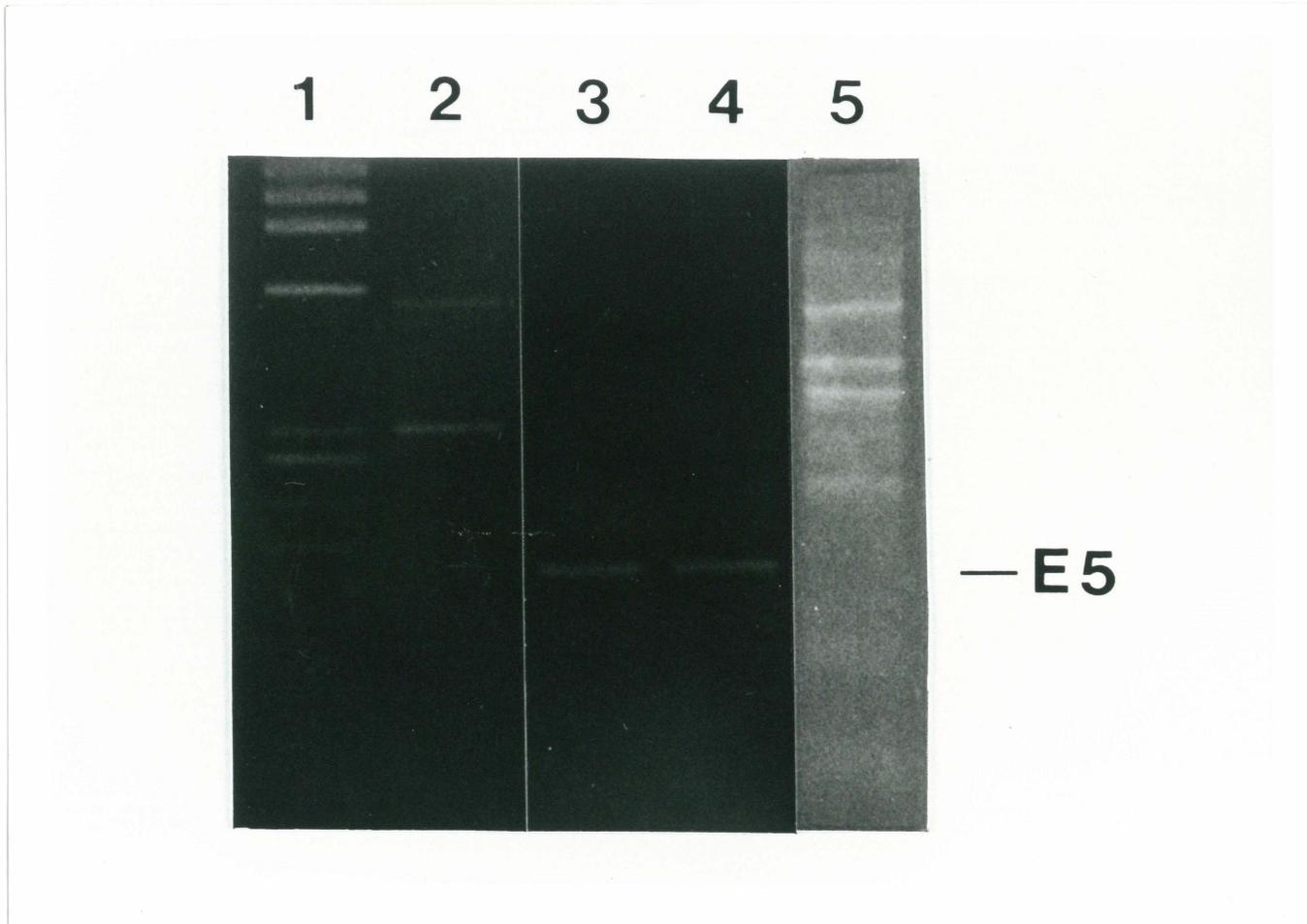
L'analyse des mélanges oligonucléotidiques par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant révèle la présence d'amorces de tailles supérieures et inférieures au signal majeur (figure 9.A). Tel que témoigné par l'amplification des exons 8-9 (figure 9.B), l'hybridation et l'extension non spécifiques des oligonucléotides contaminants ne génèrent aucun produit d'amplification détectable. La pureté des amorces apparaît sans conséquence sur le rendement des réactions PCR.

### **1.1.4 Impact du choix des températures d'hybridation ( $T_h$ )**

Le choix des températures d'hybridation s'est avéré capital dans le processus d'optimisation des conditions expérimentales des réactions PCR. Nos résultats favorisent une  $T_h$  choisie 3 à 5°C en-deça de la température de dissociation ( $T_d$ ) la plus basse du couple d'oligonucléotides employé (figure 10, pistes 3 et 4). L'utilisation d'une température d'hybridation supérieure (figure 10, piste 2) ou largement inférieure (>3 à 5°C) (figure 10, piste 5) à la  $T_d$  la plus basse, est propice aux amplifications non spécifiques. Dans les deux cas, la bande d'intérêt (186pb) est absente.



**FIGURE 9.** *Spécificité, rendement et purification des oligonucléotides utilisés pour l'amplification en chaîne de la polymérase. (A) Purification des amorces PKLA9 (piste 1) et PKLS8 (piste 2) sur gel 18% polyacrylamide-7M urée. (B) Amplification par PCR des exons 8 et 9 du gène PK-L en utilisant les oligonucléotides PKLS8 et PKLA9 purifiés (piste 2) ou non (piste 1). Les conditions des réactions PCR sont celles décrites à la figure 8. Les bandes sont visualisées sur gel d'agarose NuSieve GTG 4% en présence du marqueur de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII (M). La position du fragment correspondant aux exons 8-9 du gène PK-L est désignée par l'abréviation E8-9.*



**FIGURE 10.** Impact du choix des températures d'hybridation ( $T_h$ ) sur la spécificité des réactions PCR. L'exon 5 (186pb) du gène PK-L a été amplifié selon les conditions mentionnées à la figure 8, avec des  $T_h$  variées: 60°C (piste 2), 53°C (piste 3), 51°C (piste 4) et 47°C (piste 5). Les amorces PKLS5 et PKLA5 utilisées ont des températures de dissociation respectives de 64°C et 56°C. Un dixième (10 $\mu$ l) des produits PCR a été soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose NuSieve GTG 4% en présence du marqueur de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII (piste 1). La position du fragment correspondant à l'exon 5 du gène PK-L est désignée par l'abréviation E5.

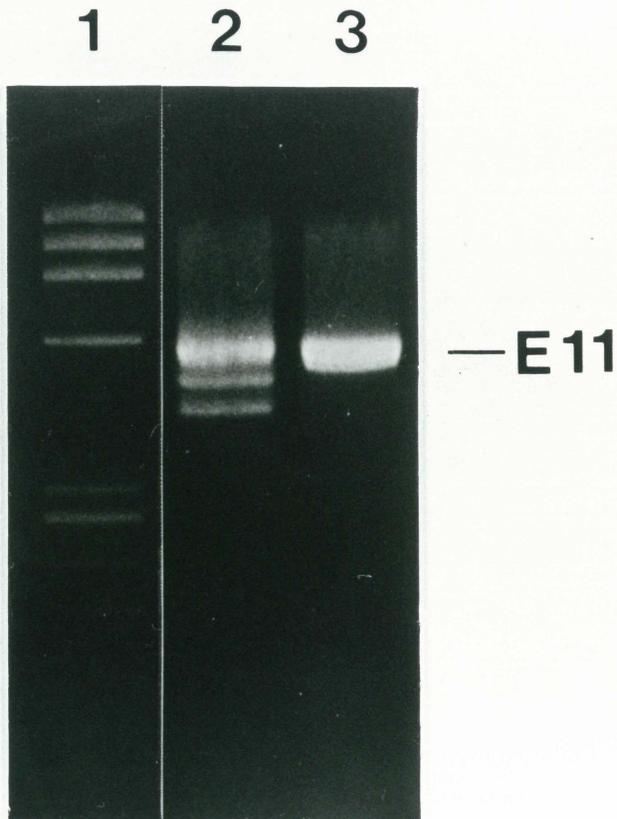
La composition des oligonucléotides influence leur  $T_d$  et, par extension, le choix des  $T_h$ . Nous observons qu'un écart important ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ) entre les températures de dissociation d'une paire d'amorces diminue l'efficacité de l'amplification. Un couple d'oligonucléotides bien conçu devrait ainsi se caractériser par des séquences dont la longueur et le contenu équivalents en (G + C) facilitent un appariement adéquat des températures de fusion.

### **1.1.5 Rôle du départ à température élevée ("hot start")**

L'amplification de segments d'ADN non désirés est souvent observée lors d'une réaction en chaîne de la polymérase. En amorçant les réactions PCR à une température supérieure à la température d'hybridation attendue, une approche désignée "hot start", nous avons cependant favorisé la spécificité des amplifications (figure 11). Le principe de la méthode repose sur la stabilité moins grande des interactions non spécifiques relativement aux interactions spécifiques, résultant des différences d'homologie de séquences. La figure 11 montre aussi qu'en défavorisant les hybridations non spécifiques, un rendement accru du fragment désiré peut s'observer.

### **1.1.6 Impact des variations de concentrations en ADN**

En raison du pouvoir inhérent de l'amplification PCR, la matrice initiale d'ADN peut être remarquablement faible en quantité et en qualité. A partir d'une séquence déjà amplifiée, quelques centaines de picogrammes suffisent (§ 1.2). L'amplification de segments spécifiques d'un gène à partir de génomes complexes requiert des quanti-



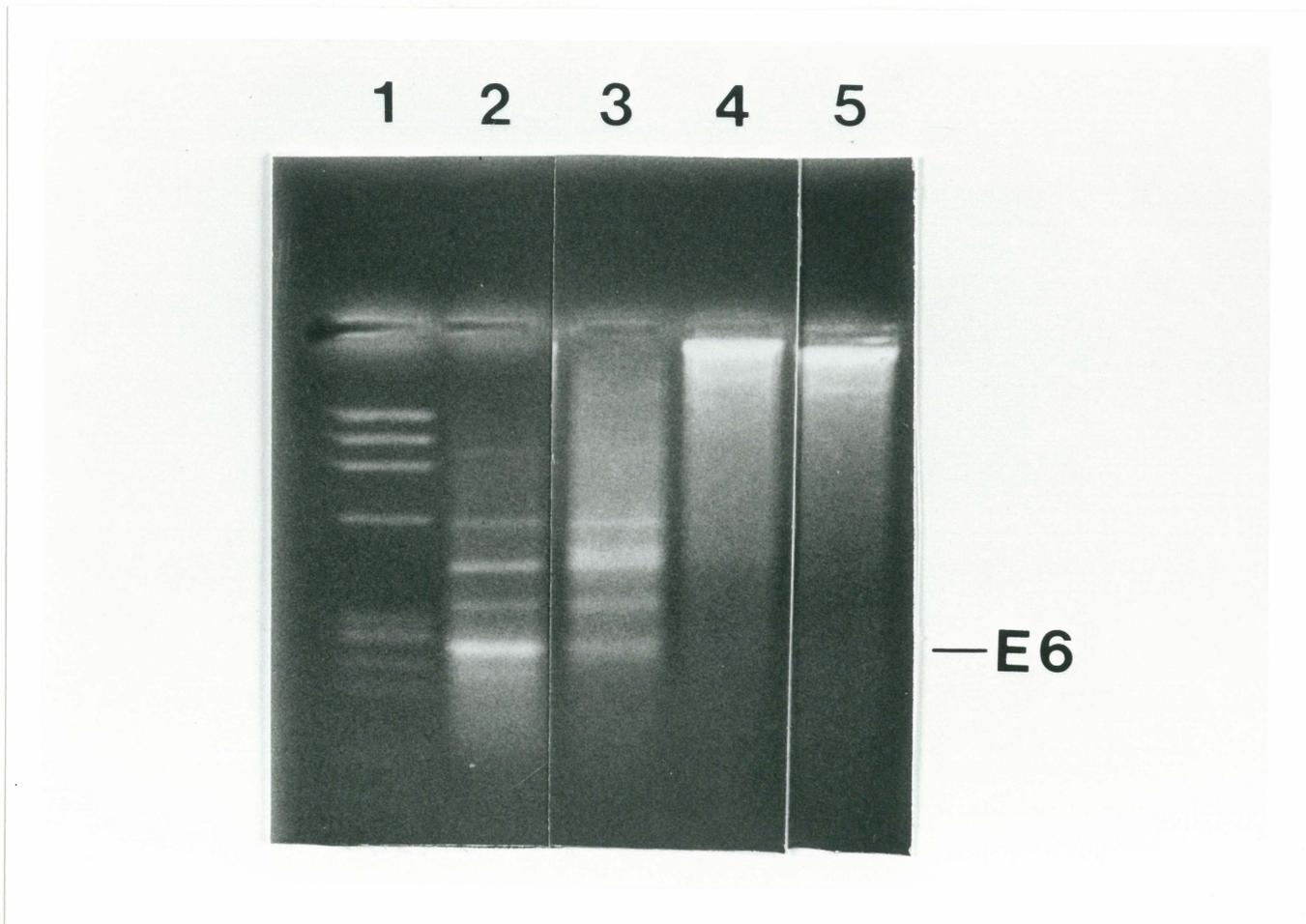
**FIGURE 11.** Rôle du départ à température élevée ("hot start") lors d'une réaction PCR. Quarante cycles d'amplification ont été amorcés avec (piste 3) ou sans (piste 2) "hot start", en présence des amorces PKLS11 et PKRTNC. Dans le premier cas, le mélange réactionnel, dépourvu du tampon PCR, a préalablement été chauffé 2 minutes à 95°C puis complété avec la composante manquante; dans le second cas, le mélange réactionnel total a directement été soumis aux 40 cycles d'amplification. Les bandes sont visualisées après coloration au bromure d'éthidium d'un gel d'agarose NuSieve GTG 4% en présence du marqueur de poids moléculaire  $\phi$ X-174 RF HaeIII (piste 1). La position du fragment correspondant à l'exon 11 du gène PK-L est désignée par l'abréviation E11.

tés d'ADN initiales plus importantes. Une quantité d'environ un microgramme d'ADN génomique lymphocytaire s'est avérée optimale pour la majorité de nos expériences. Comme en témoigne l'amplification de l'exon 6 du gène PK-L (figure 12), l'augmentation progressive des concentrations originales en ADN diminue l'efficacité des réactions PCR. Paradoxalement, en doublant la quantité d'ADN au départ, le rendement du fragment d'intérêt (270pb) est réduit de moitié (figure 12, piste 3). Aucune bande distincte n'apparaît après séparation électrophorétique des réactions PCR initialement composées de 4 ou 20 $\mu$ g d'ADN génomique (figure 12, pistes 4 et 5); des traînées intenses sont visibles et l'agrégation du matériel génétique de départ est détectable au niveau des puits.

### **1.1.7 Effet du choix commercial de l'ADN polymérase thermostable**

Deux types d'ADN polymérase thermostables ont servi aux réactions PCR. La première, l'ADN polymérase Taq, est produite par la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* et commercialisée par Cetus Corporation, Pharmacia LKB Biotechnology et Amersham; la seconde, l'ADN polymérase Pfu est isolée de *Pyrococcus Furiosus* et vendue par Stratagene.

Utilisés dans des conditions identiques, tous les enzymes n'assurent pas une spécificité et un rendement équivalents. La figure 13 illustre ces disparités. Les polymérases des fournisseurs Cetus Corporation, Pharmacia LKB Biotechnology et Stratagene génèrent des quantités analogues du fragment d'ADN désiré (599pb). Cependant, le rendement des réactions PCR catalysées par l'enzyme d'Amersham est réduit de façon appréciable. Relativement aux polymérases Taq de Cetus Corpora-



**FIGURE 12.** Impact des variations de concentrations initiales en ADN sur l'efficacité d'une réaction PCR. L'exon 6 du gène PK-L a été amplifié suivant les conditions décrites à la figure 8, en présence de 1 $\mu$ g (piste 2), 2 $\mu$ g (piste 3), 4 $\mu$ g (piste 4) ou 20 $\mu$ g (piste 5) d'ADN génomique. Les produits des différentes amplifications ont migré sur gel d'agarose NuSieve GTG 4%, avec le marqueur de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII (piste 1). La position du fragment correspondant à l'exon 6 du gène PK-L est désignée par l'abréviation E6.

tion, Pharmacia LKB Biotechnology et Amersham, l'ADN polymérase Pfu de Stratagene garantit une spécificité moins grande (figure 13, piste 5). Elle possède cependant l'avantage d'un faible taux de mauvaises incorporations conféré par son activité exonucléasique 3'→ 5'.

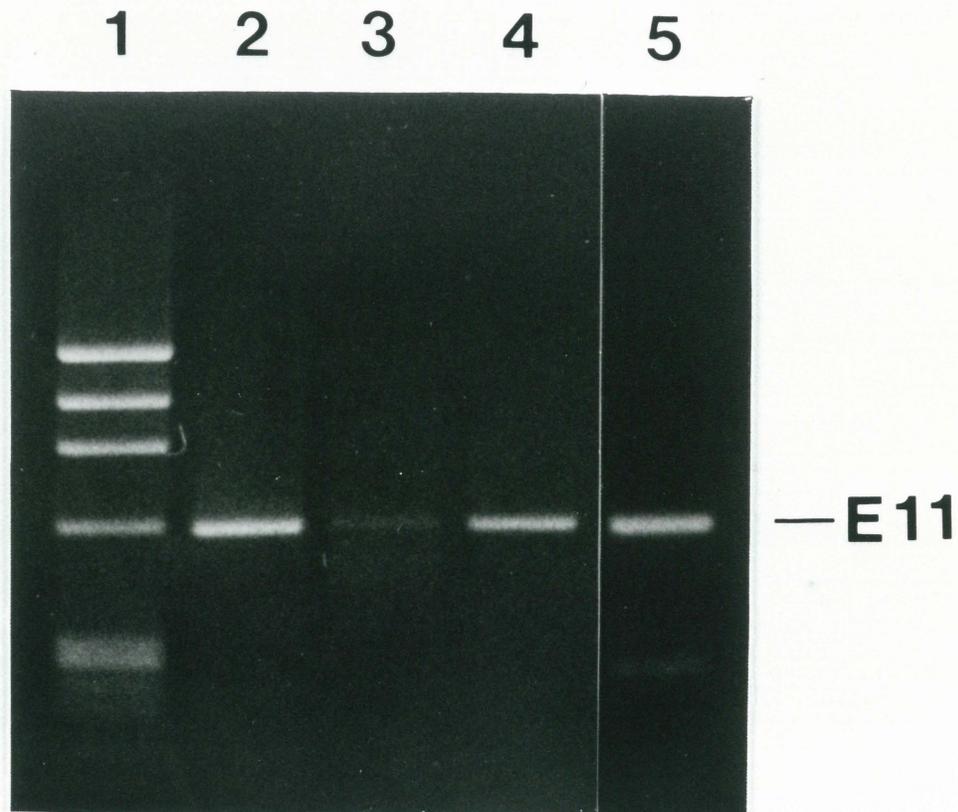
Parmi les enzymes testés, les polymérases Taq commercialisées par Cetus Corporation et Pharmacia LKB Biotechnology confèrent donc la meilleure combinaison spécificité-rendement.

## **1.2 PCR asymétrique**

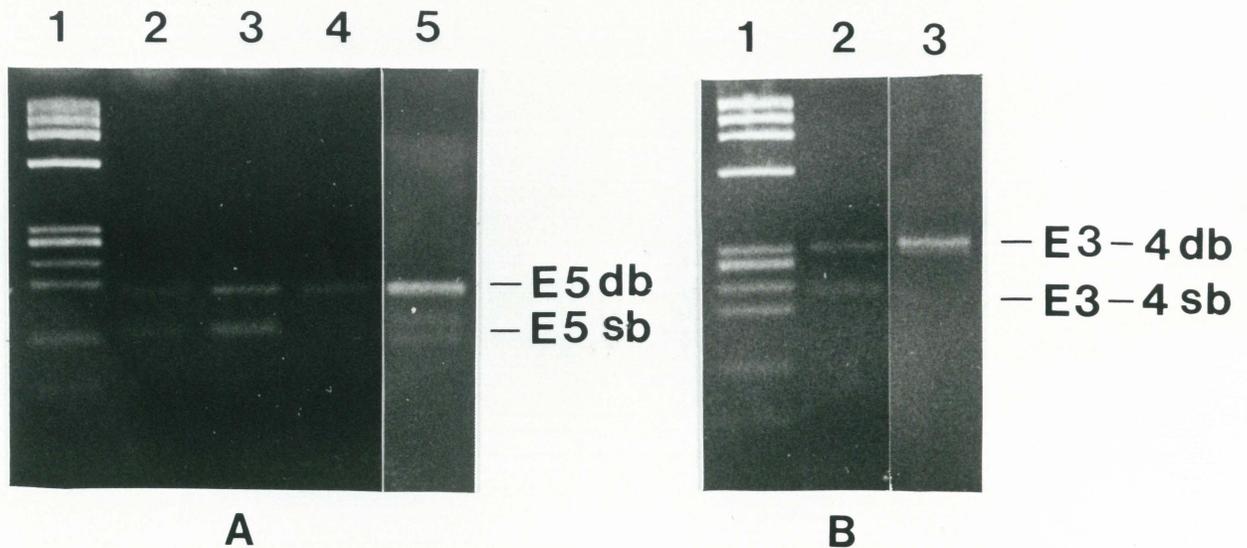
### **1.2.1 Effet des variations du rapport des concentrations des amorces utilisées**

La figure 14 compare les différents rapports d'oligonucléotides ayant servi à l'amplification asymétrique des exons 5 (figure 14.A) et 3-4 (figure 14.B). Des proportions optimales de 100:4 et 100:2 ont respectivement été obtenues. Chaque réaction en chaîne asymétrique de la polymérase nécessite en effet l'ajustement particulier et empirique du rapport des concentrations des amorces sens et antisens.

Une asymétrie trop prononcée des concentrations d'amorces abaisse les rendements d'ADN monocaténaire (figure 14.A, piste 2). Dans les cas d'asymétrie extrême (utilisation d'une seule amorce), la spécificité et le rendement des réactions sont affectés; à la figure 14.A (piste 5), l'ADN monobrin est représenté par 2 bandes (au lieu d'une seule) de faible intensité. A l'opposé, un déséquilibre insuffisant des quantités des amorces sens et antisens (figure 14.A, piste 4; figure 14.B, piste 3) en-



**FIGURE 13.** Effet du choix commercial de l'ADN polymérase thermostable. Les bandes majeures de 599pb sont visualisées sur gel d'agarose 1,5% en présence du marqueur de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII (piste 1). Les amplifications PCR, menées selon les conditions décrites à la figure 8, utilisaient les oligonucléotides PKLS11 et PKRTNC et l'une ou l'autre des ADN polymérases thermostables commercialisées par Cetus Corporation (piste 2), Amersham (piste 3), Pharmacia LKB Biotechnology (piste 4) ou Stratagene (piste 5). La position du fragment correspondant à l'exon 11 du gène PK-L est désignée par l'abréviation E11.



**FIGURE 14.** Effet des variations du rapport des concentrations des amorces utilisées pour la génération d'ADN simple brin par PCR asymétrique. Environ 1ng d'ADN double brin produit par PCR standard a été isolé sur DEAE-cellulose et réamplifié (40 cycles) en présence de différents rapports de concentrations des oligonucléotides sens et antisens. **A.** Amplification asymétrique de l'exon 5 du gène PK-L avec des ratios (picomoles) d'amorces sens:antisens de 100:2 (piste 2), 100:4 (piste 3), 100:6 (piste 4) et 100:0 (piste 5). Les positions des fragments correspondant aux formes double brin et simple brin de l'exon 5 du gène PK-L sont désignées par les abréviations E5db et E5sb, respectivement. **B.** Amplification des exons 3-4 du gène PK-L avec des rapports (picomoles) d'oligonucléotides sens:antisens de 100:2 (piste 2) et 100:4 (piste 3). Les positions des fragments correspondant aux formes double brin et simple brin des exons 3-4 du gène PK-L sont désignées par les abréviations E3-4db et E3-4sb, respectivement. Les échantillons (10 $\mu$ l) ont été chargés sur gel d'agarose NuSieve GTG 4% en présence du marqueur de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII (pistes 1).

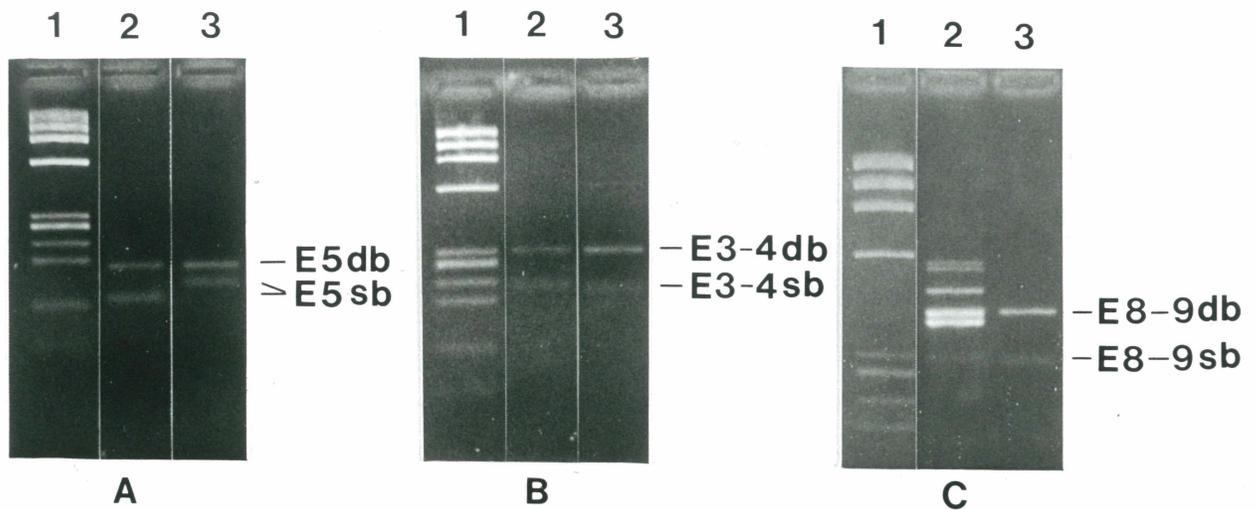
genre des fragments d'ADN exclusivement double brins.

### **1.2.2 Génération d'ADN monocaténaire sens versus antisens**

La conformation adoptée par une molécule d'ADN monocaténaire affecte sa migration sur gel d'agarose. A la figure 15 (A, B et C), toutes les bandes correspondant à la forme simple brin des fragments amplifiés, présentent, tel qu'attendu, un poids moléculaire apparent inférieur à celui des fragments bicaténaires. Dans certains cas, cependant, les structures secondaires et tertiaires empruntées par les séquences d'ADN monobrin sont telles qu'un poids moléculaire apparent supérieur est détectable sur gel d'agarose (résultats non montrés).

La réciproque d'un rapport asymétrique de concentrations d'amorces permet de générer des fragments d'ADN simple brin de sens opposé (antisens) à l'orientation originale (sens). Comme l'indique la figure 15.A, la position prise sur gel d'agarose par la séquence sens de l'exon 5 du gène PK-L diffère de la position prise par la séquence antisens. Les figures 15.B et 15.C montrent toutefois des migrations identiques pour les fragments d'ADN simple brin sens et antisens correspondant aux exons 3-4 et 8-9.

L'une des orientations possibles (sens ou antisens) de l'amplification asymétrique est souvent favorisée. A la figure 15.C, le PCR asymétrique des exons 8-9 présente une spécificité plus importante dans l'orientation sens qu'antisens. Cette caractéristique s'avère utile lors du séquençage direct de produits PCR monobrins (§ 1.4.3).

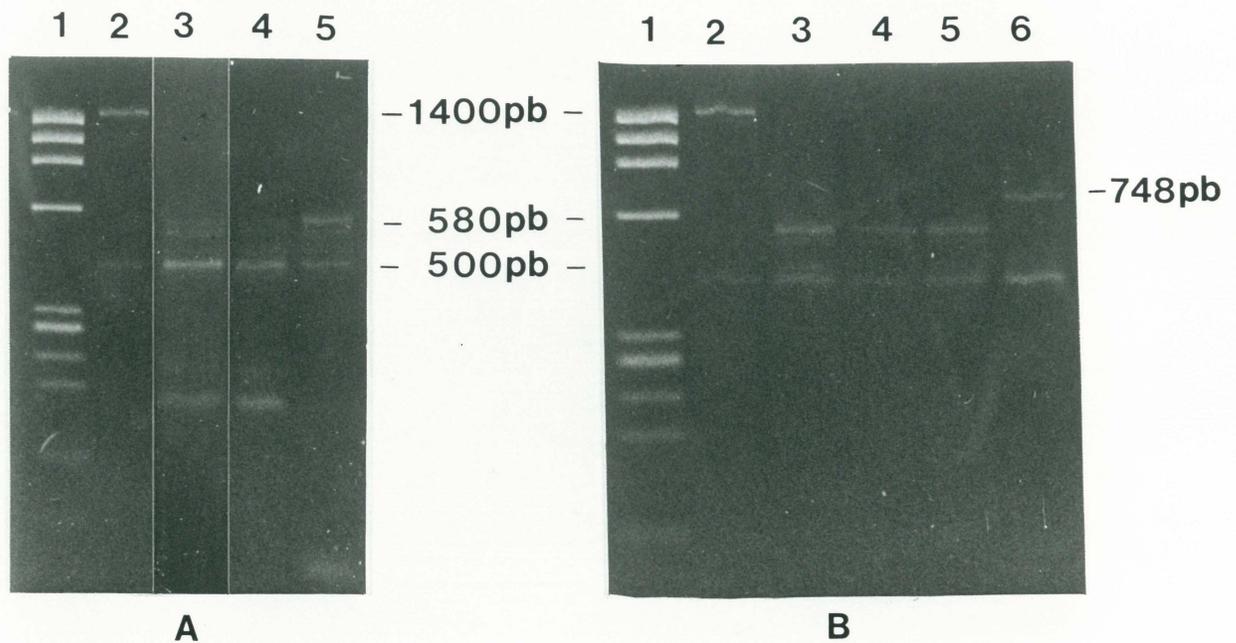


**FIGURE 15.** Génération d'ADN monocaténaire sens versus antisens. Les fragments d'ADN monobrins du gène PK-L ont été amplifiés comme décrit à la figure 14 et visualisés sur gel d'agarose NuSieve GTG 4% avec le marqueur de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII (pistes 1). A. Amplification asymétrique de l'exon 5 avec des rapports (picomoles) d'amorces sens:antisens de 100:4 (piste 2) et 4:100 (piste 3). Les positions des fragments correspondant aux formes double brin et simple brin de l'exon 5 du gène PK-L sont désignées par les abréviations E5db et E5sb, respectivement. B. PCR asymétrique des exons 3-4 utilisant des ratios d'oligonucléotides sens:antisens de 100:2 (piste 2) et 2:100 (piste 3). Les positions des fragments correspondant aux formes double brin et simple brin des exons 3-4 du gène PK-L sont désignées par les abréviations E3-4db et E3-4sb, respectivement. C. Réactions d'amplifications asymétriques des exons 8-9 avec des rapports (picomoles) d'amorces sens:antisens de 4:100 (piste 2) et 100:4 (piste 3). Les positions des fragments correspondant aux formes double brin et simple brin des exons 8-9 du gène PK-L sont désignées par les abréviations E8-9db et E8-9sb, respectivement.

### 1.3 RT-PCR

Du fait même de sa sensibilité, la méthode RT-PCR permet, en principe, de détecter des ARN dont il n'existe qu'une seule copie dans une cellule sur 1000, ce qui semble être le cas des transcrits correspondant à des gènes spécifiques d'un type particulier de différenciation tissulaire hors des cellules où ils s'expriment normalement. Ce phénomène, appelé "transcription illégitime" par les groupes de Chelly (Chelly et al, 1989) et Sarkar (Sarkar et al, 1989), permet d'analyser dans n'importe quelle cellule d'accès facile, les transcrits de n'importe quel gène jusqu'alors supposé spécifique de types cellulaires particuliers. Sur la base de cette théorie, nous avons voulu utiliser le RT-PCR pour amplifier, à partir des ARN messagers (figure 16.A) ou totaux (figure 16.B) lymphocytaires, les exons 7 à 10 de l'ADNc de l'isoenzyme PK-R, normalement exprimé au niveau des globules rouges.

Le segment du gène PK-L délimité par les exons 7 et 10 couvre, au niveau du génome, une séquence d'environ 1400pb, dont 748pb représentent les exons et ~652pb, les introns. A partir d'ADN génomique, l'amplification contrôlée de cette région du gène PK-L induit la synthèse d'une séquence de taille attendue, 1400pb (figure 16.A, piste 2). Une bande non spécifique de ~500pb est aussi apparente. En utilisant une matrice initiale d'ARN messagers lymphocytaires (figure 16.A), la réaction RT-PCR ne permet pas l'amplification du fragment désiré de 748pb. Indépendamment de l'enzyme utilisé (polymérase Taq ou RT-AMV) et des conditions expérimentales choisies (avec ou sans DMSO, présence ou absence d'une étape d'exten-



**FIGURE 16. Optimisation des conditions expérimentales pour la méthode RT-PCR.**

**A.** Réactions RT-PCR initiées à partir d'ARN messagers lymphocytaires. Les transcrits ont d'abord été recopiés en un brin d'ADN complémentaire par extension de l'amorce PKLS11E, à l'aide de l'enzyme RT-AMV (pistes 4 et 5). Dans un second temps, les exons 7 à 10 de l'ADNc ont été amplifiés avec (piste 5) ou sans (piste 4) DMSO et extension préliminaire de 40 minutes. A la piste 3, les exons 7-10 des transcrits lymphocytaires ont été directement amplifiés par la polymérase Taq, sans DMSO. L'amplification contrôle des exons 7 à 10 à partir d'ADN génomique est présentée au puits 2 (1400pb). Les bandes non désirées de 500pb et 580pb sont indiquées.

**B.** Réactions RT-PCR initiées à partir des ARN totaux isolés de lymphocytes humains (pistes 3 et 5) ou d'un foie foetal humain (pistes 4 et 6). Les enzymes RT-AMV (pistes 3 et 4) et RT-MMuLV (pistes 5 et 6) ont servi à la transcription inverse des ARN. Les matrices ont été soumises à 40 cycles d'amplification en présence de DMSO et sans omission de l'étape préliminaire d'extension de 40 minutes. La piste 2 montre les produits de l'amplification contrôle des exons 7-10 à partir d'ADN génomique (1400pb). Toutes les bandes sont visualisées sur gel d'agarose NuSieve GTG 4% en présence du marqueur de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII (pistes 1). Les bandes non désirées de 500 et 580pb sont indiquées. Le fragment de 748pb correspond au produit attendu.

sion de 40 minutes), une bande non spécifique de 500pb est systématiquement produite, manifestement à partir d'ADN génomique contaminant la préparation d'ARN polyadénylés. Tel que proposé par Frohman et al (1988), le mélange réactionnel d'un RT-PCR a également été suppléé par l'agent dénaturant DMSO (10% (v/v)) et soumis à une extension préliminaire de 40 minutes. Ces modifications ont entraîné la production d'un fragment non désiré de 580pb. Cette séquence est absente des produits des réactions amorcées sans DMSO (figure 16.A, piste 4) ou à partir d'ADN génomique (figure 16.A, piste 2); on la retrouve cependant après réaction RT-PCR menée à température élevée avec la polymérase Taq. Ces résultats suggèrent qu'une déstabilisation des structures secondaires des ARNm, par la chaleur ou le DMSO, soit responsable de l'amplification du fragment de 580pb, démontrant l'importance de l'un ou l'autre de ces facteurs dénaturants dans une réaction RT-PCR.

Une seconde expérience (figure 16.B), a permis d'apprécier l'importance du choix de la matrice initiale d'ARN et du type de transcriptase inverse (RT) utilisée. Les ARN totaux isolés de lymphocytes ou d'un foie foetal humains, ont servi aux amplifications RT-PCR. En utilisant la RT-AMV (et du DMSO), les bandes caractéristiques de 500 et 580pb, déjà obtenues à partir d'une matrice d'ARNm, sont aussi visualisées dans les deux cas (figure 16.B, pistes 3 et 4). Cependant, la réaction catalysée par la RT-MMuLV engendre la séquence de taille attendue (748pb) lorsqu'une matrice d'ARN totaux isolés d'un foie foetal humain est initialement utilisée (figure 16.B, piste 6). A partir d'ARN totaux lymphocytaires, la réaction est négative. Vraisemblablement, l'amplification du produit désiré à partir des ARN totaux du foie

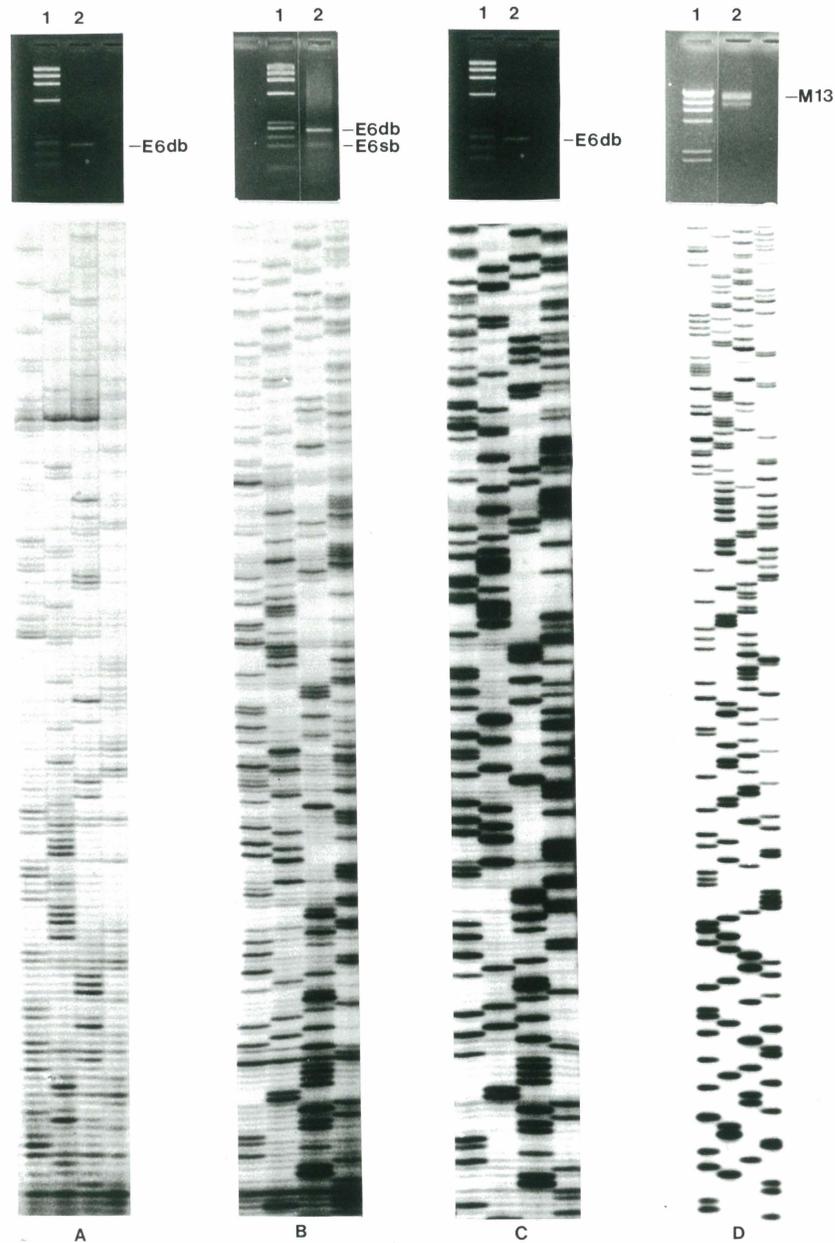
foetal, a été favorisée par l'abondance, dans cet organe, des transcrits de l'isoenzyme PK-L. Au contraire, la rareté des messagers PK chez les cellules lymphocytaires expliquerait l'incapacité à les amplifier.

Les résultats des expériences RT-PCR favorisent donc l'utilisation combinée de l'agent dénaturant diméthylsulfoxyde (DMSO) et d'une transcriptase inverse isolée du "*Moloney Murine Leukemia Virus*". Des quantités appréciables de lymphocytes humains faciliteraient la détection des transcrits PK-R peu abondants dans ce type cellulaire.

## **1.4 PCR et séquençage**

### **1.4.1 Influence de la nature double brin ou simple brin et de la qualité de l'ADN**

La lisibilité d'une séquence dépend de la nature et de la qualité du matériel génétique utilisé pour le séquençage (figure 17). Même si plusieurs auteurs ont décrit le séquençage direct de produits PCR double brin (Wrischnik et al, 1987; Higuchi et al, 1988; Newton et al, 1988), les protocoles disponibles pour la préparation de matrices d'ADN bicaténaire pour le séquençage ont plutôt été développés pour les plasmides circulaires fermés. Cette méthode présente des difficultés inhérentes lorsqu'appliquée aux fragments amplifiés par PCR, en raison d'une réassociation rapide des brins d'ADN courts et linéaires (figure 17.A). Le problème est détourné en utilisant des fragments d'ADN simple brin générés par PCR asymétrique (figure 17.B). L'optimisation du rapport des concentrations des amorces sens et antisens



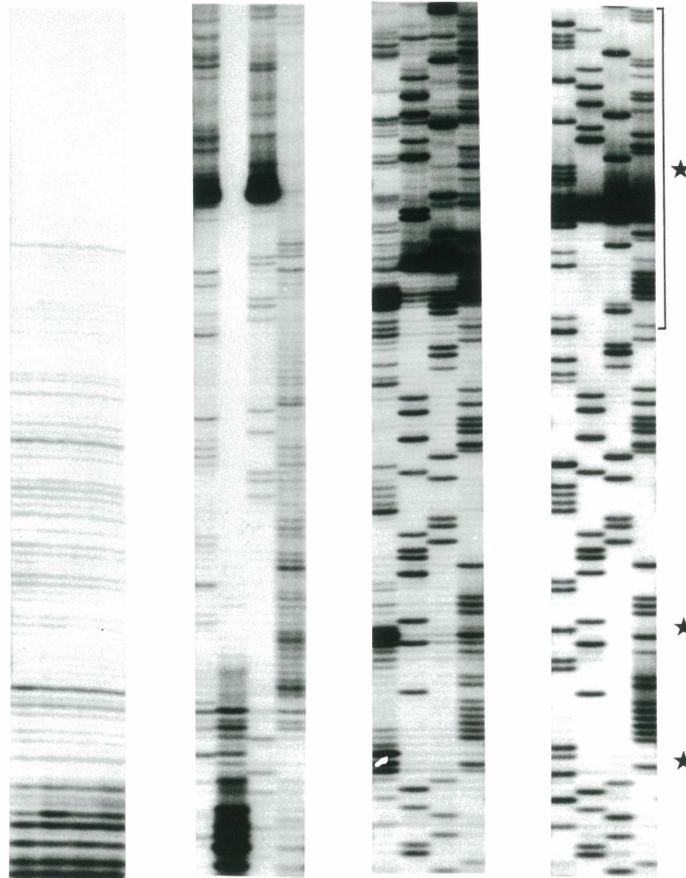
**FIGURE 17.** Comparaison des résultats d'un séquençage direct et des séquences d'un fragment d'ADN cloné. Le matériel génétique séquencé est visualisé sur gel d'agarose au-dessus des séquences correspondantes (pistes 2) en présence des marqueurs de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII (pistes 1.A, B et C) ou  $\lambda$ HindIII (piste 1.D). L'isotope  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  a été utilisé pour toutes les réactions. A. Séquençage direct de la forme bicaténaire de l'exon 6 (E6db) du gène PK-L amplifiée par PCR standard. B. Séquençage direct de la forme simple brin de l'exon 6 (E6sb) du gène PK-L amplifié par PCR asymétrique en présence d'un rapport (picomoles) des concentrations des amorces PKLS6:PKLA6 de 100:2. C. Séquençage de l'exon 6 (E6) du gène PK-L amplifié par PCR standard puis cloné au site SmaI du phagemide M13 pBluescript II KS<sup>+</sup>. D. Séquençage d'une portion du génome monocaténaire de bactériophage M13mp18 (brin (+)).

(§ 1.2.1) permet d'amplifier du matériel monobrin généralement assez abondant et de qualité suffisante pour que puisse être déterminée efficacement sa séquence nucléotidique. La qualité d'un séquençage direct est généralement équivalente à celle d'une séquence réalisée à partir de la forme double brin du vecteur de clonage pBluescript KS<sup>+</sup> (figure 17.C) ou à partir du génome monobrin du bactériophage M13 (figure 17.D).

#### **1.4.2 Effet du choix de l'ADN polymérase et de la configuration des mélanges nucléotidiques - Rôle du DMSO**

La figure 18 montre l'impact de ces facteurs sur la qualité du séquençage direct de fragments d'ADN monocaténares générés par PCR asymétrique.

La polymérase Taq s'est avérée inadéquate pour la détermination directe de séquences nucléotidiques. L'inefficacité de l'enzyme était particulièrement manifeste en présence du mélange de nucléotides normaux. Une résolution supérieure des bandes s'observait toutefois en combinant l'utilisation d'analogues nucléotidiques (7-déaza dGTP) avec un second type d'enzyme, l'ADN polymérase T7 (figure 18). Plusieurs compressions, de même qu'une intensité inégale des bandes visualisées sur autoradiogrammes, rendaient encore incertaine la lecture de nombreuses portions des séquences. Tel que suggéré par Winship (1989), les structures secondaires responsables des compressions observées ont été déstabilisées en menant les réactions de séquences en présence de l'agent dénaturant diméthylsulfoxyde. Avec la polymérase T7, le DMSO permet ainsi de lever la majorité des ambiguïtés et équilibre l'intensité



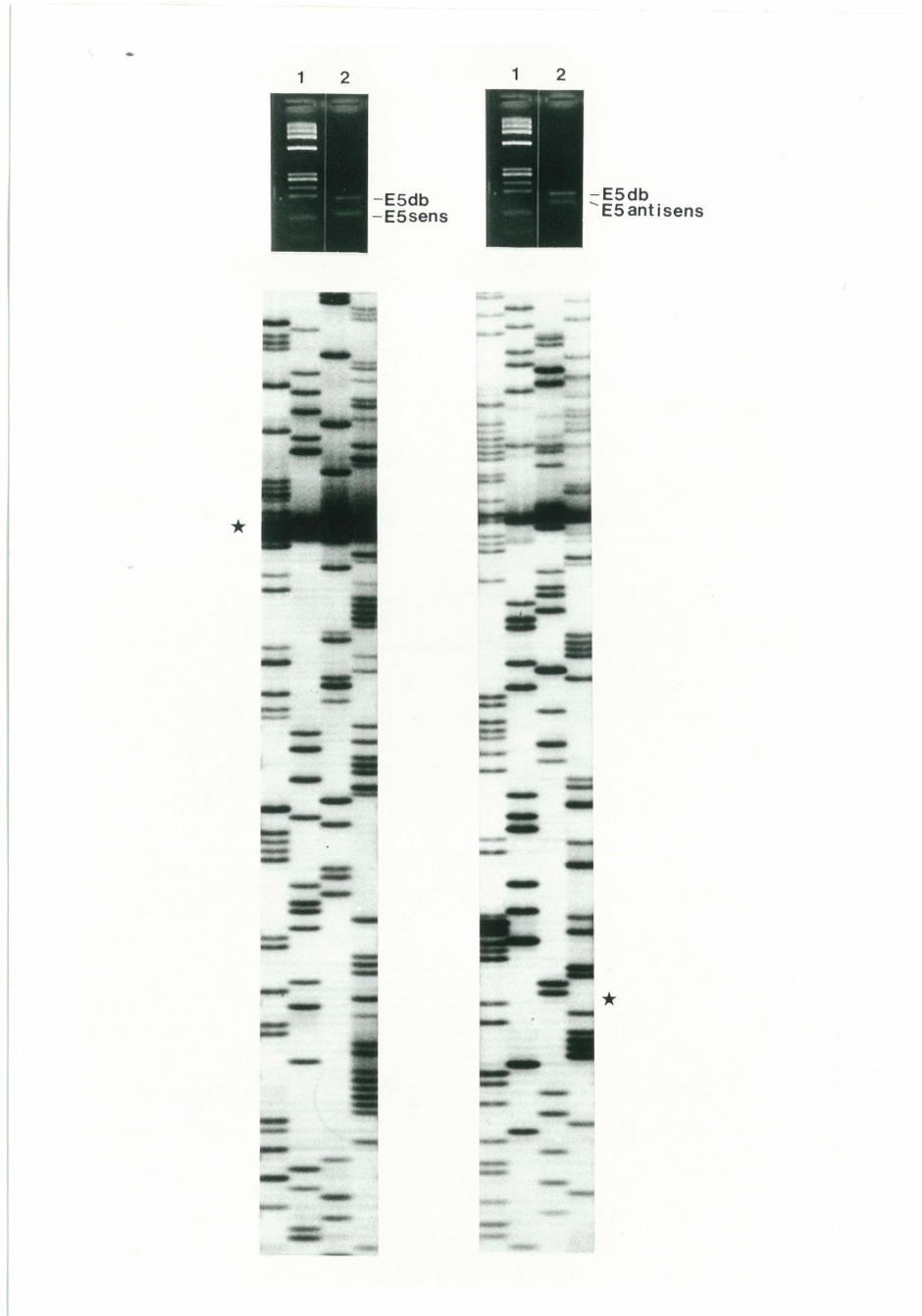
Enzyme	Taq	Taq	T7	T7
Configuration	Nt normaux	Déaza	Déaza	Déaza
DMSO	Non	Non	Non	Oui

**FIGURE 18.** Effet du choix de l'ADN polymérase et de la configuration des mélanges nucléotidiques - Rôle du DMSO. L'exon 5 du gène PK-L a été amplifié par PCR asymétrique en présence d'un rapport (picomoles) optimal des amorces PKLS5:PKLA5 de 100:4. L'ADN simple brin a directement été séquencé par les ADN polymérases isolées de la bactérie thermophile (polymérase Taq) ou du bactériophage T7 (polymérase T7) et en utilisant l'oligonucléotide limitant de l'amplification asymétrique. Deux configurations de mélanges nucléotidiques ont été employées (les nucléotides normaux ou l'analogue 7-déaza-2'-déoxyguanosine 5' triphosphate), avec ou sans diméthylsulfoxyde (DMSO). Les symboles ★ montrent les compressions résolues, partiellement ou totalement, par ajout de DMSO. L'isotope  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  a été utilisé pour toutes les séquences.

relative des bandes. Toutefois, le DMSO inhibe partiellement (~ 50%) l'activité de la polymérase Taq à des concentrations de 10% (v/v); à 20% DMSO, l'activité résiduelle de l'enzyme n'atteint que 11% (Gelfand, 1989).

### **1.4.3 Effet de l'orientation sens ou antisens de la matrice d'ADN**

Tel qu'illustré à la figure 19, la détermination complète d'une séquence nucléotidique nécessite fréquemment le séquençage des réactions PCR réciproques (sens et antisens). En dépit des conditions optimales utilisées, la séquence de l'exon 5 orientée sens présente une ambiguïté de lecture aux bases 508 à 510 de l'isoenzyme PK-R. Le séquençage des produits de l'amplification antisens du même exon résout l'incertitude.



**FIGURE 19.** Effet de l'orientation sens ou antisens de la matrice d'ADN monobrin sur l'efficacité du séquençage direct. Le matériel génétique séquencé est visualisé sur gel d'agarose NuSieve GTG 4% au-dessus des séquences correspondantes (pistes 2) en présence du marqueur de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII. Les deux séquences ont été effectuées suivant les conditions optimales décrites à la figure 18, en présence de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP. A. Séquençage de la forme simple brin sens de l'exon 5 du gène PK-L amplifiée par PCR asymétrique en présence d'un rapport (picomoles) des amorces PKLS5:PKLA5 de 100:4. B. Séquence directe de l'amplification réciproque de (A) (antisens). Dans les deux cas, l'amorce limitante respective du PCR asymétrique a été utilisée pour le séquençage. Les symboles ★ montrent la compression résolue par séquençage de l'amplification antisens. Les positions des fragments correspondant aux formes double brin et simple brin de l'exon 5 du gène PK-L sont désignées par les abréviations E5db et E5sb, respectivement.

## **2. Etude du gène PK-L et de la déficience en PK-R**

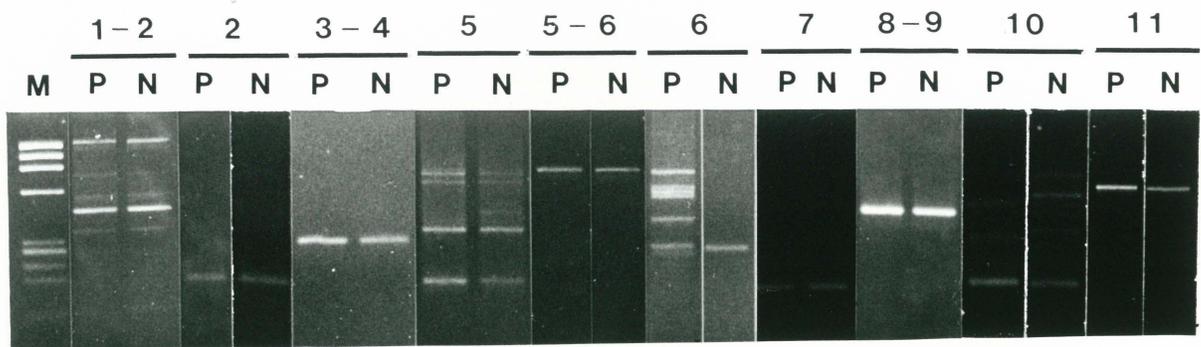
Nous disposons des séquences nucléotidiques complètes des ADNc PK-L (Tani et al, 1988a) et PK-R humains (Kanno et al, 1991). Celles-ci nous ont permis de diriger une recherche des altérations de séquences au niveau des régions codantes et certains introns du gène PK-L, chez un patient (A.C.) atteint d'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire par déficience en PK-R. Ces travaux apportent également des éléments nouveaux à la connaissance du gène PK-L.

### **2.1 Recherche d'anomalies génétiques responsables de la déficience en PK-R**

#### **2.1.1 Absence de mutations dans les régions codantes et introniques**

Une série d'amplifications PCR standards couvrant les régions codantes et les introns 1, 3, 5 et 8 du gène PK-L ont été effectuées à partir du génome lymphocytaire des individus A.C. (malade) et H.B. (contrôle). La figure 20 compare les produits d'amplification bicaténaires du patient et de l'individu normal. Comme prévu, la taille des fragments générés par PCR ne révèle aucune insertion ou délétion importante détectable sur gel d'agarose.

Chaque produit a été cloné et quelques clones indépendants séquencés. La majorité des fragments ont également été investigués par séquençage direct (tableau 9). Nos résultats indiquent qu'aucune mutation spécifique pour A.C. et responsable de la déficience en PK-R n'est présente au niveau des régions codantes (exon R à 11) et des portions séquencées des introns 1, 3, 5 et 8 (§2.3) du gène PK-L.



**FIGURE 20.** Comparaison des produits d'amplification PCR double brin du gène *PK-L* du patient (P) anémique A.C. et de l'individu normal (N) H.B. Les réactions PCR ont été réalisées comme décrit à la figure 8. La région couverte par chaque amplification est montrée au-dessus des pistes par les numéros des exons correspondants. Les couples d'exons indiqués incluent l'intron les unissant (introns 1, 3, 5, 8 pour les couples R-2, 3-4, 5-6 et 8-9, respectivement). Les tailles des fragments sont indiquées au tableau 9. Les bandes sont visualisées sur gel d'agarose NuSieve GTG 4% en présence du marqueur de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII (M).

**TABLEAU 9. INVESTIGATION DES ANOMALIES GENETIQUES RESPONSABLES DE LA DEFICIENCE EN PK-R CHEZ A.C.: SOMMAIRE DES REGIONS DE L'ISOENZYME PK-R AMPLIFIEES, CLONEES ET SEQUENCEES**

Régions *	# clones	Séquence directe	Taille (pb)
R-2	2	Non	~ 1500 <sup>‡</sup>
2	0	Oui	183
3-4	2	Oui	320 <sup>‡</sup>
5	0	Oui	186
5-6	2	Non	~ 850 <sup>‡</sup>
6	0	Oui	270
7	2	Oui	153
8-9	5	Oui	412 <sup>‡</sup>
10	2	Oui	183
11	2	Oui	599 <sup>¶</sup>

\* Les régions de l'isoenzyme PK-R sont identifiées par le numéro des exons les délimitant. Les fragments 1-2, 3-4, 5-6 et 8-9 incluent les introns 1, 3, 5 et 8, respectivement.

‡ La longueur des introns 1 et 5 est évaluée à 1085 et 400pb, respectivement; celle des introns 3 et 8 a été fixée à 95 et 94pb respectivement (§ 2.3).

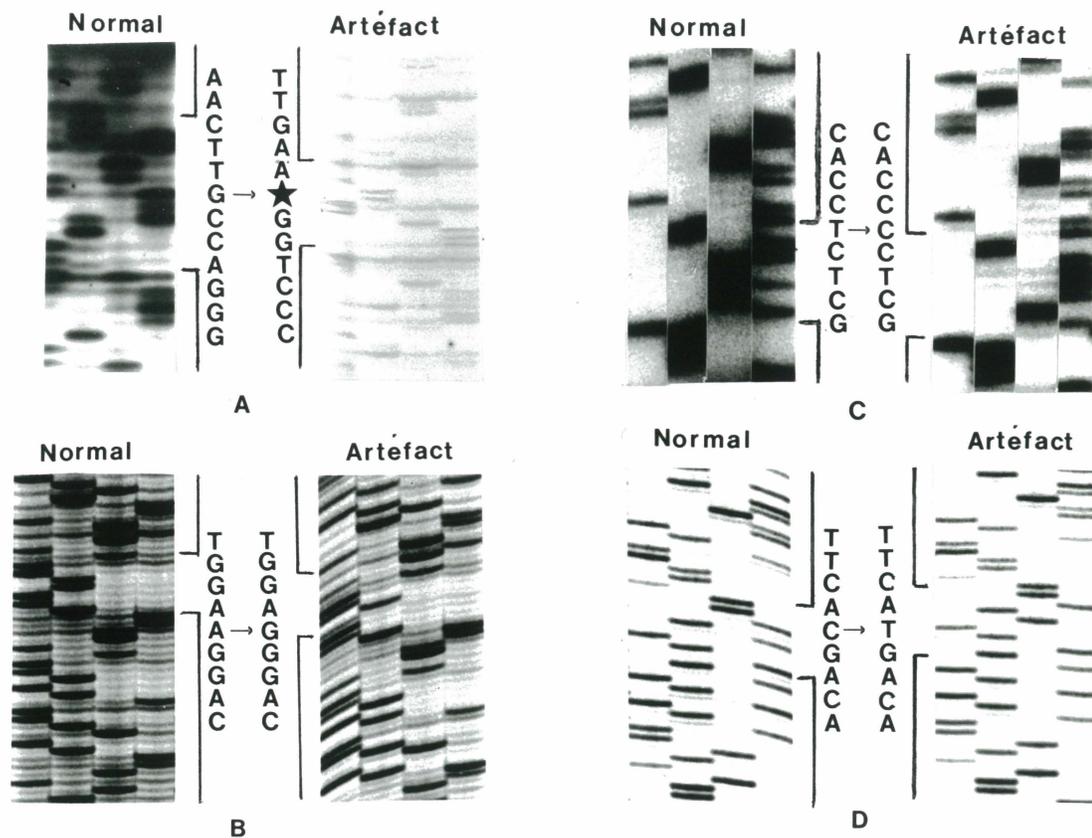
¶ La région codante de l'exon 11 couvre 107pb. Les amorces sens (PKLS11E) et antisens (PKRTNC) permettent l'amplification des 105 dernières et 494 premières bases des régions codante et non codante de l'exon 11, respectivement.

### 2.1.2 Mutations et artéfacts

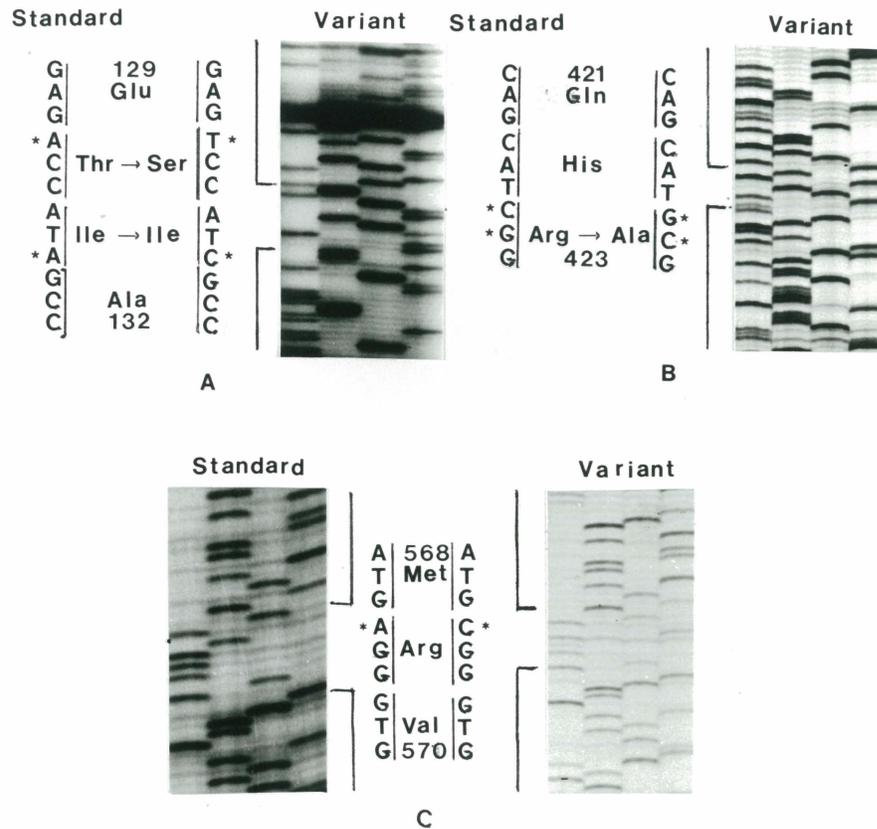
La recherche de lésions génomiques par séquençage nucléotidique de fragments PCR clonés est souvent compliquée par l'introduction d'artéfacts de séquences. A quatre reprises, nos analyses ont été confrontées à de tels artéfacts (figure 21). Dans un cas, une compression électrophorétique a conduit au faux diagnostic d'une délétion <sup>762</sup>G (exon 6 de l'isoenzyme PK-R) avec décalage de phase du cadre de lecture (Larochelle et al, 1991). La séquence du brin d'orientation opposée a confirmé l'artéfact (figure 21.A). Des substitutions artéfactuelles ont également été détectées: <sup>206</sup>A → G (exon 2 de l'isoenzyme PK-R); <sup>416</sup>T → C (exon 4) et <sup>1397</sup>C → T (exon 9), tel qu'illustré aux figures 20.B, 20.C et 20.D, respectivement. Ces artéfacts ont été discernés par séquençage de clones indépendants.

### 2.2 Identification de variants PK-R non pathologiques

La confrontation de la séquence standard de l'ADNc PK-R (Tani et al, 1988; Kanno et al, 1991) avec celles obtenues dans notre laboratoire, dévoile des variations de séquences systématiques au niveau de certaines positions nucléotidiques (figure 22). Deux substitutions altèrent l'exon 4 de l'isoenzyme PK-R aux positions <sup>388</sup>A → T et <sup>393</sup>A → C. Dans un cas, l'acide aminé correspondant est modifié (<sup>130</sup>Thr → Ser); dans le second, la variation de séquence est silencieuse (<sup>131</sup>Ile → Ile) (figure 22.A). La figure 22.B illustre la transition de deux bases moyennes de l'exon 8 (<sup>1267</sup>C → G; <sup>1268</sup>G → C), conduisant au remplacement <sup>423</sup>Arg (CGG) → Ala (GCG). Ces variants ont été rencontrés chez A.C. et quatre individus supplémentaires d'origine Cana-



**FIGURE 21.** Artéfacts rencontrés lors de l'investigation des mutations responsables de la déficience en PK-R chez A.C. Les séquences ont été obtenues directement à partir de fragments PCR (panneau A) ou après clonage des produits PCR dans pBluescript KS<sup>+</sup> (panneaux B, C, D). A. Artéfact introduit par compression électrophorétique entraînant la délétion apparente d'une base de l'exon 6 de l'isoenzyme PK-R. Des substitutions artéfactuelles ont été détectées au niveau de B. l'exon 2; C. l'exon 4 et D. l'exon 9 de l'isoenzyme PK-R. De gauche à droite, les séquences sont lues G, A, T, C.



**FIGURE 22. Identification de variants PK-R non pathologiques.** Les produits PCR clonés au site *Sma*I du vecteur *pBluescript II KS*<sup>+</sup> ont été séquencés par la méthode décrite par Sanger et al (1977). Les variations de séquences ont été observées aux exons 4 (A), 8 (B) et 11 (C) de l'isoenzyme PK-R. En A et B, les sujets analysés sont d'origine Canadienne-Française; en C, le polymorphisme silencieux a été détecté chez un individu asiatique établi en Estrie (T.L.N., tableau 4). Les bases substituées sont identifiées par les symboles \* et les positions de certains acides aminés sont identifiées selon la numérotation utilisée pour l'isoenzyme PK-R.

dienne-Française, deux contrôles (P.G. et H.B.) et deux patients déficients en pyruvate kinase (ME.Du. et Ma.G.). Ces divergences peuvent représenter des erreurs dans la séquence standard publiée, ou alternativement, indiquer des sites polymorphes naturels. Les deux possibilités n'ont pu être discriminées de façon certaine. De plus, aucune des modifications de séquences identifiées ne correspond aux mutations PK-Tokyo (ou PK-Beirut ou PK-Nagasaki), PK-Linz ou PK-Fukushima (ou PK-Mae-bashi) originant toutes, outre PK-Linz d'origine turque, de patients asiatiques (Kanno et al, 1991; Neubauer et al, 1991; Kanno et al, 1992).

Une mutation silencieuse à l'arginine 569 de l'isoenzyme PK-R a été rapportée chez des individus japonais (Kanno et al, 1992). Nous avons identifié le même polymorphisme chez un sujet normal d'origine orientale établi au Québec (T.L.N., tableau 4). Pourtant, l'analyse du génome de deux Canadiens (A.C. et H.B.) révélait systématiquement la séquence nucléotidique standard à cette position (figure 22.C).

## **2.3 Séquences nucléotidiques des introns 1, 3, 5 et 8 du gène**

### **PK-L**

Les régions comprises entre les exons R-2, 3-4, 5-6 et 8-9 ont été partiellement ou entièrement séquencées. Les séquences, identiques chez les deux sujets étudiés, sont présentées à la figure 23. La taille des fragments générés après amplification PCR des différents couples d'exons a permis d'approximer la longueur des introns 1 et 5 à 1085 et 400pb, respectivement; la taille des introns 3 (95pb) et 8 (94pb) a été confirmée par séquençage. Les séquences aux frontières exons-introns, de même qu'aux

## A. INTRON 1

```

5'GTAAGAAGGGGAGACAGAAGCCATGGAACATAGGAGGAAAATGAGGGTGAAA
ACTAGGAGCCAGGGTGGAGGGCCATAAATGATCCACATCAGCCACTGGCTAGGTGG
GTTTTCGAGAGGAACGTACGTTCTTCAGAGCCTCCCGTGTGTAAATTATGGACCCTG
GCCTGGGTCTTTTCCAGGCCCTATAGGCAGGCCAGAGCCACAGCATGTAAGCCACGG
GGCACTCCCGTGGTTCTGGACTCTGGCCCCTGGCATAACAGGGCCTTCCAATGGAAC
AGGAGACAGTGGTGACACTTTAACCAGTCTGCAGAACTGATCCCCAGGCCAGCTGG
ATCCCTCATGCCTCTGACAACCCAACAGTGTGGAGCAGACCCACAGAGAGGGAGACC
CAGAGAGGTGTGCAGTGGC[ATGGAA]***** ~500pb*****ACATTAACTTAGTACCGTC
TTTATAGGATCCTTGTGACATAATAAATAATATATGCATGATGCCAGCTCATAAGAA
GGGAAGGAACAGAGGGTATGCTGAGAGACGAAGGGCATGGGGAGGAAGGGCAGGT
GACATGCAGTCCCTGAGCCCCCTTCTACCACAG 3'

```

## B. INTRON 3

```

5'GTGCGGGACGGGCCCGGGCAGTGGGTGGGGCAGGAGGATGCCTCGAGGTCCT
GGCCACCTTCCCTGAAACCTGCTCCGACTCCCTCCCAG3'

```

## C. INTRON 5

```

5'GTGCGGACGCGCCTCCCGCCCTGACCACATCCGTGCGCTGGGCACATTCCCTTCTC
CTTGGCTCCCATCAGACCTCAGACCGATCACACCTTNCCTGGCAGCGTTTGACAGAT
CGTCAGGAGATCCAGGCGTATGATCTGGTAGCC***** ~250pb*****3'

```

## D. INTRON 8

```

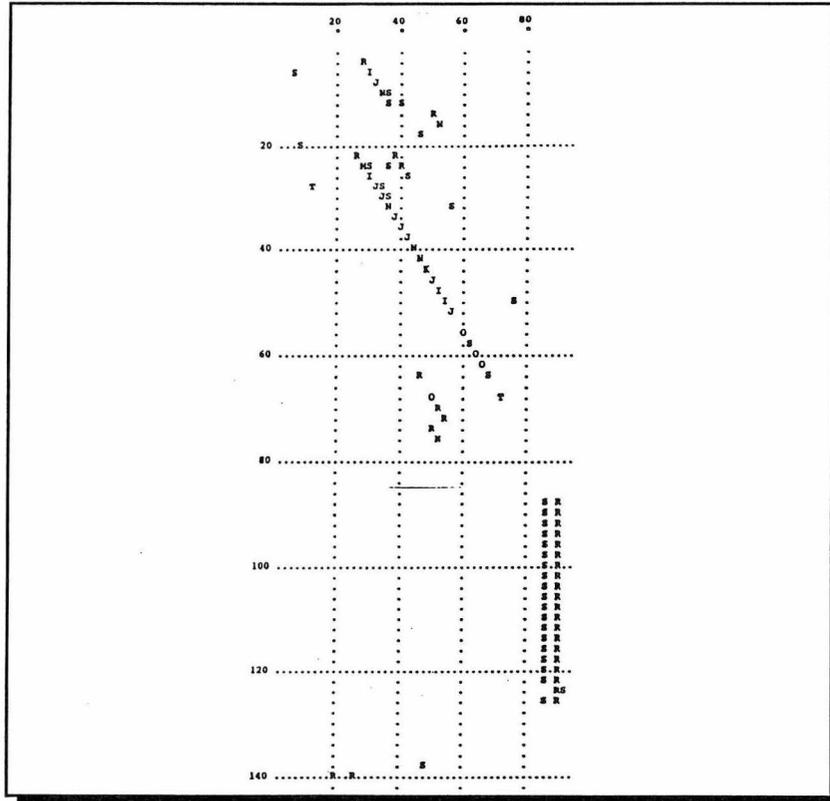
5'GTAGGAGCTCAGAATGAAAAGCAAATGGGCCAGGGAACCAAATCCCTTCCATACCC
CAGTGCCCTTCCAGACTAACAATTCTGGCACCTGCAG3'

```

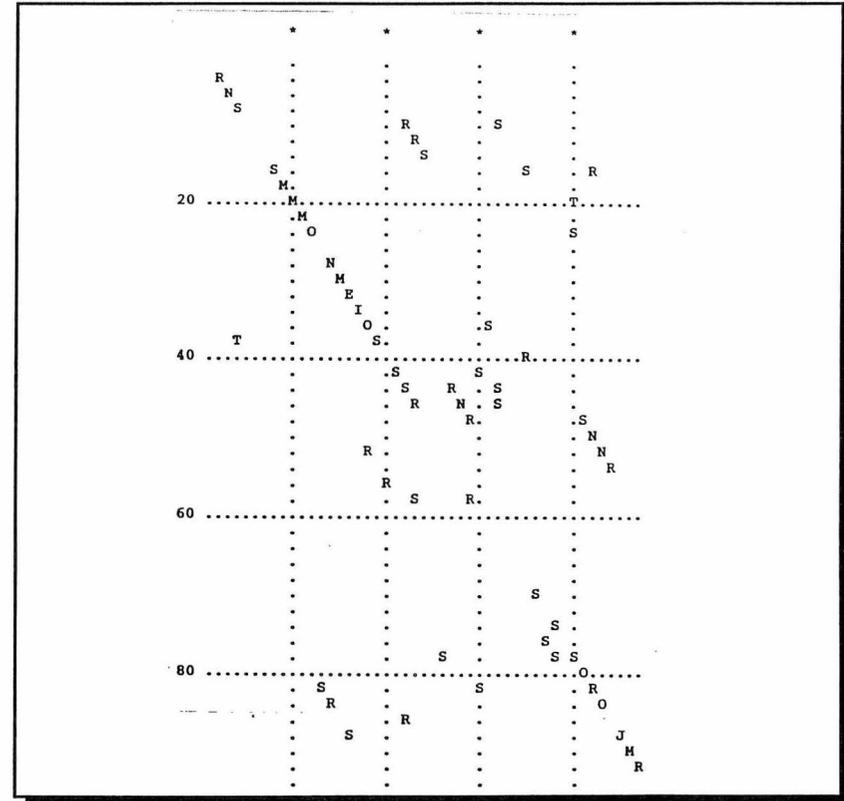
**FIGURE 23.** Séquences nucléotidiques des régions introniques comprises entre les exons R-2 (A), 3-4 (B), 5-6 (C) et 8-9 (D). Les portions non séquencées des introns sont indiquées par un nombre approximatif de bases. Les nucléotides GT et AG, en caractère gras, représentent les séquences consensus d'épissage 5' et 3', respectivement. Les sites de branchement putatifs sont soulignés. L'exon L de l'isoenzyme PK-L (intron 1) est encadré par le symbole [ ]. La lettre N (intron 5) figure pour l'un ou l'autre des dNTP.



### INTRON 3



### INTRON 8



**FIGURE 24.** *Similarité des séquences introniques 3 et 8 du gène PK-L humain et de rat. Les introns sont comparés par matrices d'homologie ("Pustell Sequence Analysis Program"). Une valeur d'homologie est assignée, par une lettre, à chaque position XY après comparaison d'une série de 11 nucléotides (range= 5) de la séquence X (intron 3 ou 8 humain) avec la séquence Y (intron 3 ou 8 de rat): A= 100%; B= 98-99%; ...U= 60-61%. Les valeurs en-deça de 60% d'homologie ne sont pas indiquées. Les diagonales témoignent de régions d'homologie supérieure ou égale à 60%. Une région divergente apparaît comme un bris dans la diagonale suivi de sa réapparition le long de la même ligte. Les séries de diagonales parallèles (intron 3) révèlent l'existence d'une région répétée.*

sites de branchement sont comparées, au tableau 10, avec les séquences consensus établies par Mount (1982) et Ruskin et (1984). Toutes les jonctions d'épissage respectent la règle GT-AG. Les séquences des sites de branchement probables des introns 1, 3 et 8 suivent le consensus et sont respectivement localisées à 158, 25 et 17 nucléotides du site d'épissage 3'.

Les pyruvate kinases de type L humaine et de rat présentent une homologie de 86,9% au niveau des séquences nucléotidiques codantes (Tani et al, 1988). De la même façon, les introns entièrement séquencés (3 et 8) du gène PK-L humain ont été comparés aux séquences correspondantes chez le rat. Une analyse informatisée par matrice d'homologie (figure 24) a permis d'aligner les séquences; une similarité plus importante a été observée entre les introns 8 (65,9%) qu'entre les introns 3 (57,8%) des deux espèces. L'alignement des séquences des introns 3 révèle également l'existence d'une séquence répétée  $[TC]_{23}$  présente chez le rat mais absente chez l'humain, et principalement responsable des différences de tailles des introns (144pb pour le rat (Noguchi et al, 1987) et 95pb chez l'humain).

## **2.4 Séquence nucléotidique du promoteur PK-L**

La portion de l'intron 1 en amont de l'exon L (figure 23) représente la région promotrice de l'isoenzyme PK-L. Tel qu'illustré à la figure 25, la séquence du promoteur PK-L humain identifiée a été comparée à la séquence correspondante publiée chez le rat (Noguchi et al, 1987). L'alignement des séquences révèle une homologie globale de 46%.

L'isoenzyme de type L est exprimé de façon tissu-spécifique. Par "footprinting" et mesure de l'expression des gènes de fusion PKL/CAT, Vaultont et al (1989) et Yamada et al (1990) ont parallèlement identifié et caractérisé trois éléments régulateurs du promoteur PK-L actifs en cis, requis pour la spécificité tissulaire de l'expression du gène PK-L. Ces séquences, désignées PKL-I, PKL-II et PKL-III (Yamada et al, 1990) ou L1, L3 et L4 (Vaultont et al, 1989), ont respectivement été localisées entre les nucléotides -92 et -110, -142 et -165, -166 et -186 (figure 25). Vaultont et al (1989) ont également identifié l'élément régulateur L2 entre les bases -118 et -133.

Les séquences correspondant à ces 4 régions régulatrices du promoteur PK-L du rat sont hautement conservées chez l'humain. Des homologies respectives de 84%, 75%, 83% et 95% sont observées pour PKL-I (L1), L2, PKL-II (L3) et PKL-III (L4) (figure 25).

Le gène de la pyruvate kinase de type L du rat appartient aussi à la catégorie des gènes précisément contrôlés par la diète et les hormones (Vaultont et al, 1986). Thompson et Towle (1991) ont montré qu'une séquence de 101 bases du promoteur conférait l'activité régulatrice au gène PK-L du rat (nucléotides -112 à -213). Une séquence correspondante du promoteur PK-L humain (nucléotides -126 à -219) y est homologue à 83%.

De façon inattendue, l'analyse de la séquence promotrice humaine révèle l'absence d'une boîte Hogness ("TATA box"). De même, tel que proposé, pour le rat, par Noguchi et al (1987), aucune séquence homologue au consensus établi pour une

```

[-413] GTAAGAAGGGGAGACAGAAGCCATGGAACATAGGAGGAAAATGAGGGTGAAAAGTAG [PKL-h]
      ***** ** * ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *
[-366] GTAAGAAGAGGA-AGGGAAGCCACTGAAGAGAG-AGGAGAATTAGGGT-AGAA-T-- [PKL-r]

[-356] GAGCCAGGGT-G-----GAGGGCCATAAATGATCCACATCAGCCACTGGCTAGGT [PKL-h]
      *** ** *          ***** ** * *                               **
[-315] ----CAGCGTTGAGAGATGGAGG-CC-T---T-----GT [PKL-r]

[-307] GGGTTTTTCGAGAGGAACGTACGTTCTTCAGAGCCTCCCGTGTGTTAAATTATGGACC [PKL-h]
      ***      * ***** * * * * * * ***** * ** * ***** ** *****
[-290] GGG-----G-TAGGA-TGCCAAT-----ATAGCCTCACCTGGGCTAAA-TACAGACC [PKL-r]

[-250] CTGGCCTGGGTCTTT--TCCAGGCCCTATAGGCAGGCCA-----GAGCCA-CAGCAT [PKL-h]
      **  *** * ***** ***** ** ** *****          ** *** *****
[-245] -TGATCTGAGCCTTTGATCCAGGCTCTGCAGACAGGCCAAAGGGGATCCAGCAGCAT [PKL-r]

[-201] GTAAGCCACGGGGCACTCCCGTGGTTCCTGGACTCTGGCCCCTGGCATAACAGGGCCT [PKL-h]
      *  ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *
[-189] GGGCGCCACGGGGCACTCCCGTGGTTCCTGGACTCTGGCCCCAGTGTACAAGG-CT [PKL-r]
      |
      PKL-III/L4          PKL-II/L3
[-144] TCCAATGGAACAGGAGACA-----GTGGTGACACTTTAACCAGTCTGCAGAACT [PKL-h]
      ***  *** ** *** *          ***** * *****          * ***
[-133] TCCGTTGG--CA--AGAGAGATGCTAGCTGGTTATACTTTAACCAG-----G-ACT [PKL-r]

      L2          PKL-I/L1
[-95] GAT-----CCCCAGGCCAGCTGGATCCCTCATGCCTCTGACAACCCAACAG [PKL-h]
      **          * *****          *** ** *****          ***
[-87] CATCTCATCTGAGC--CAGGCC-----CATCCCACTGACAAAGGCGCAG [PKL-r]

[-48] TGTGGAGCAGACCCACAGAGAGGGAGACCCAGAGAGGTGTGCA--GT-G--GCATG [PKL-h]
      * * *****          * *** ***** *** ** * *****
[-44] TATAAAGCAGACCCACAGA-----CACAG-CAGGTAAGCAACGTAGCAGCATG [PKL-r]

```

**Boîte TATA**

**FIGURE 25.** Comparaison des séquences promotrices PK-L humaine et de rat. La séquence promotrice du gène PK-L humain (PKL-h) (positions -413 à +3) est montrée en comparaison avec celle publiée pour le rat (PKL-r) (positions -366 à +3) (Vaulont et al, 1989; Yamada et al, 1990; Cagnet et al, 1991). La position +1 a été assignée à l'adénine du codon d'initiation de la traduction (ATG). Chez les deux espèces, des espaces (-) ont été introduits pour un alignement optimal des séquences; les astérisques (\*) identifient les nucléotides identiques. Les éléments régulateurs PKL-I (ou L1), L2, PKL-II (ou L3) et PKL-III (ou L4) et l'emplacement de la boîte TATA chez le rat sont identifiés.

boîte CAAT (GGNCAATCT) (Stryer et al, 1988) n'est décelable dans le promoteur PK-L humain.

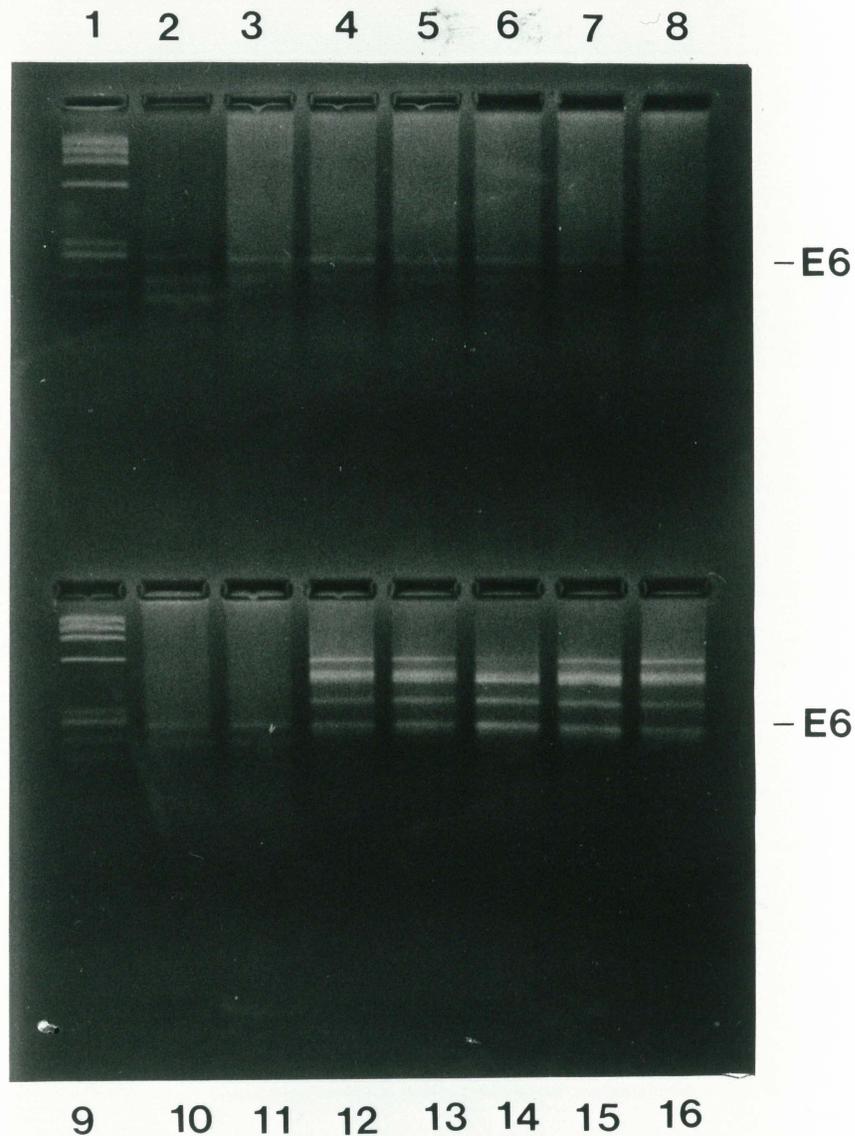
### **3. Identification de marqueurs génétiques associés à l'anémie hémolytique**

#### **3.1 Caractérisation de produits PCR spécifiquement amplifiés à partir d'ADN lymphocytaire d'individus anémiques**

L'électrophorèse des produits d'amplification de l'exon 6 du gène PK-L révèle, en plus du fragment attendu de 270pb, un patron de bandes multiples apparaissant spécifiquement chez les patients atteints d'anémie hémolytique congénitale. Tel qu'illustré à la figure 26, ces bandes additionnelles ont été constatées chez 4 des 5 patients anémiques testés; elles étaient pourtant absentes des produits PCR de 7 individus normaux. Cette spécificité d'apparition des séquences supplémentaires ou marqueurs génétiques, nous convainquit de l'importance à entreprendre leur caractérisation.

##### **3.1.1 Etude familiale**

L'éventuelle transmission héréditaire des marqueurs génétiques a été investiguée par une étude familiale unique (F41). Dans la famille du patient Ma.G., dont les parents ont été diagnostiqués hétérozygotes pour la déficience en PK-R (tableau 5), le patron de bandes multiples générées par PCR ne s'observe qu'avec le patient hémolytique (figure 27).



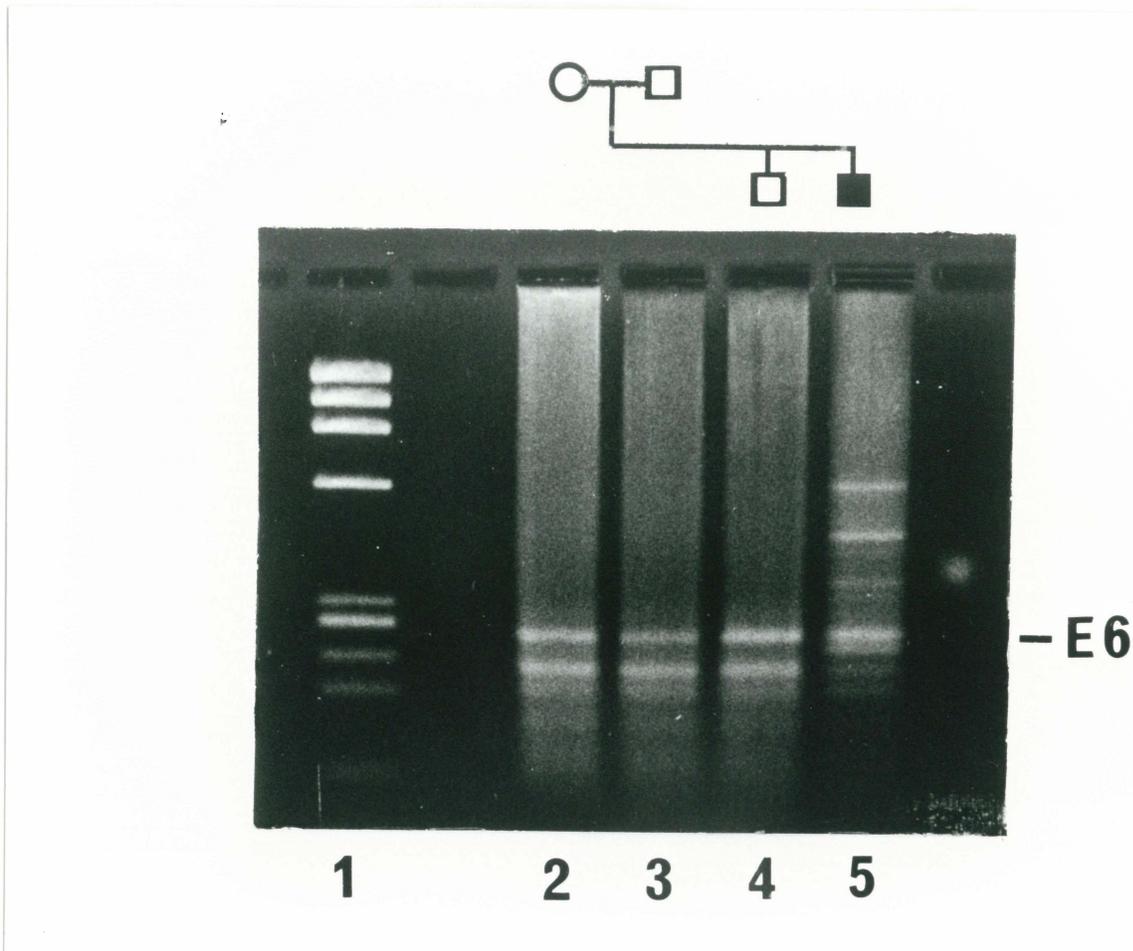
**FIGURE 26.** Amplification PCR de l'exon 6 du gène PK-L d'individus normaux ou atteints d'anémie hémolytique congénitale par déficience en pyruvate kinase érythrocytaire. Les réactions ont été effectuées de façon standard: un microgramme d'ADN génomique lymphocytaire a été soumis à 40 cycles d'amplification en présence de 1 $\mu$ M de chacune des amorces PKLS6 et PKLA6, 0,2 $\mu$ M dNTP, 5U de polymérase Taq et 1X tampon PCR incluant 10mM MgCl<sub>2</sub>. Pistes 2 à 8: sujets contrôles (D.B., Y.B., H.B., A.G., A.L., N.L., J.R., respectivement); pistes 10 et 11: patient N.Boi.; pistes 12 et 13: patient G.G.; piste 14: patient ME.Du.; piste 15: patient Ma.G.; piste 16: patient A.C.. Les bandes sont visualisées sur gel d'agarose NuSieve GTG 4% en présence du marqueur de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII (pistes 1 et 9). Les positions des fragments correspondant à l'exon 6 du gène PK-L sont désignées par l'abréviation E6.

### **3.1.2 Clonage et séquençage des bandes supplémentaires produites par PCR**

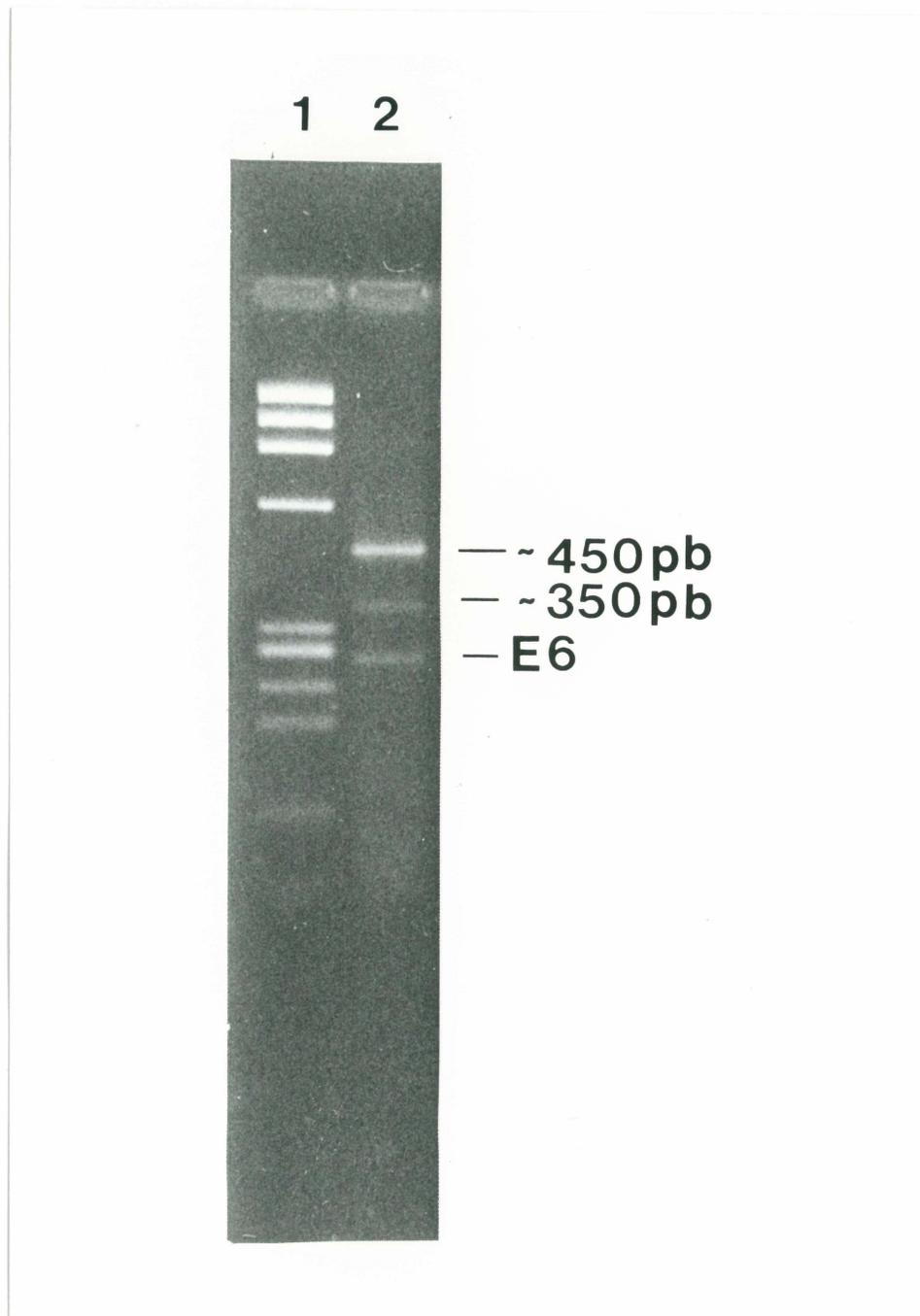
Plusieurs paramètres influençant la spécificité d'une amplification PCR ont déjà été envisagés (§ 1.1). L'impact d'un départ à température élevée ("hot start") sur l'apparition des séquences supplémentaires est présenté à la figure 28. Dans ces conditions optimales, le patron de fragments additionnels est réduit à deux bandes d'environ 350 et 450pb (figure 28). Du patron anormal initialement observé, ces deux fragments supplémentaires ont été clonés et séquencés comme décrit respectivement aux sections 5 et 6 du chapitre "Matériel et méthodes".

#### **3.1.2.1 Sélection et vérification des clones**

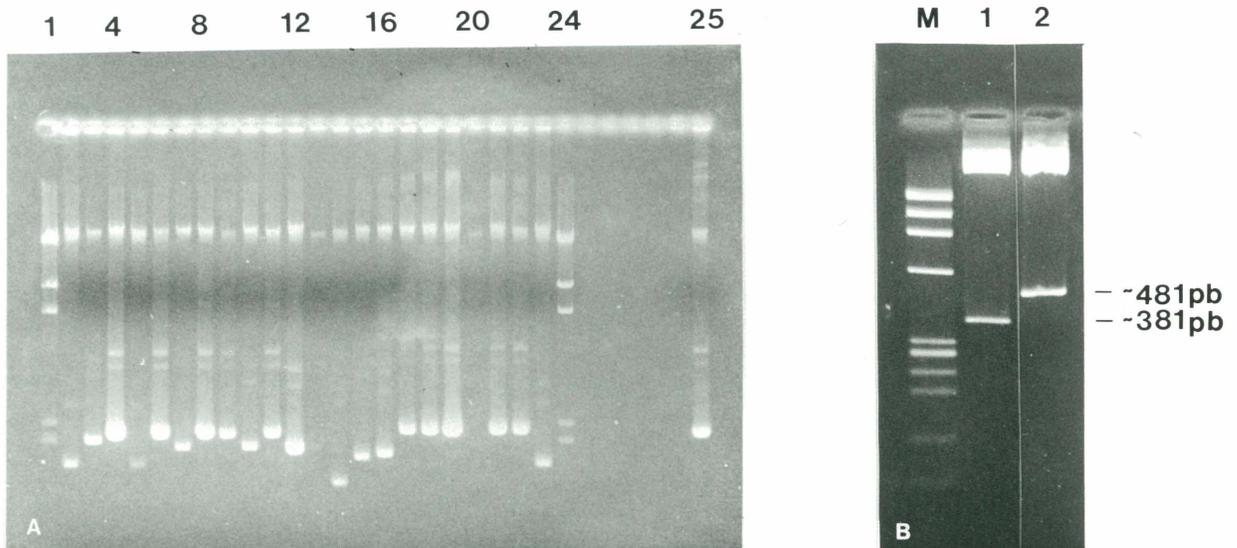
Les expériences de transformations du phagemide pBluescript II KS<sup>+</sup> ligué aux fragments supplémentaires ont atteint des efficacités d'environ  $7 \times 10^6$  cellules transformées/ $\mu$ g de vecteur. Vingt-deux colonies blanches ont été repiquées et mises en culture. La figure 29.A présente une micropréparation d'ADN effectuée sur ces cultures. Dix plasmides apparaissent de taille supérieure au vecteur original. Une double digestion avec les enzymes de restriction HindIII et BamHI a permis de certifier la taille attendue des fragments d'ADN insérés pour chaque recombinant. Ces enzymes coupent respectivement aux positions 689 et 719 du pBluescript II KS<sup>+</sup>, ne laissant que 31 paires de bases provenant du vecteur, rattachées aux inserts. La figure 29.B montre les résultats des digestions pour deux des dix transformants.



**FIGURE 27.** Etude familiale des marqueurs génétiques associés à l'anémie hémolytique congénitale par déficience en pyruvate kinase. Les réactions PCR ont été effectuées suivant les conditions décrites à la figure 26. Les pistes 2 à 5 montrent l'amplification PCR de l'exon 6 du gène PK-L des membres de la famille du patient Ma.G. (F41, tableau 4): mère (piste 2), père (piste 3), frère (piste 4) et patient Ma.G. (piste 5). L'abréviation E6 représente la position du fragment attendu de 270pb correspondant à l'exon 6 du gène PK-L. Les bandes sont visualisées sur gel d'agarose NuSieve GTG 4% en présence du marqueur de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII (piste 1).



**FIGURE 28.** Impact d'un départ à température élevée ("hot start") sur la spécificité des produits d'amplification de l'exon 6 du gène PK-L de patients anémiques. La réaction PCR a été effectuée comme décrit à la figure 26 mais avec "hot start" (piste 2). Les deux bandes supplémentaires (~350pb et ~450pb) (comparer avec la figure 26) ont été clonées et séquencées. La position du fragment correspondant à l'exon 6 du gène PK-L est désigné par l'abréviation E6. La piste 1 montre le marqueur de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII.



**FIGURE 29.** Sélection et vérification des recombinants obtenus lors du clonage des fragments supplémentaires générés par amplification PCR de l'exon 6 du gène PK-L de patients anémiques. **A.** Sélection des transformants par micropréparation d'ADN. Les pistes 2 à 16 montrent les résultats du criblage pour la bande supplémentaire de ~350pb; aux pistes 17 à 23 figurent les plasmides isolés après clonage du fragment supplémentaire de ~450pb. Les bandes sont visualisées sur gel d'agarose 0,8% en présence du marqueur de poids moléculaires  $\lambda$ HindIII (pistes 1 et 24) et du vecteur sauvage pBluescript KS<sup>+</sup> (piste 25). Les puits 3, 5, 7, 8, 10, 17, 18, 19, 21 et 22 montrent les plasmides de taille supérieure au vecteur original obtenus après clonage des fragments de ~350pb et ~450pb. **B.** Vérification des transformants par digestion double HindII-BamHI. Les bandes de ~381pb (piste 1) et ~481pb (piste 2) obtenues correspondent aux séquences supplémentaires de ~350pb et ~450pb auxquelles sont attachées 31 pb du vecteur laissées après coupure par les enzymes HindIII et BamHI.

### 3.1.2.2 Analyse des séquences

Deux clones correspondant aux fragments supplémentaires de ~350pb et ~450pb ont été séquencés et respectivement désignés *hmf1* et *hmf2* ("hemolysis related factor 1 et 2"). *Hmf1* (numéro d'accèsion pour le GenBank: M-64700) présente une homologie de 48% avec la région 3' non codante du gène du récepteur du facteur de croissance humain dérivé des plaquettes (figure 30). *Hmf2* (numéro d'accèsion pour GenBank: M-64701) code pour un cadre de lecture ouvert de 451pb caractérisé par une homologie de 47% avec la région 5' codante du gène de l'interféron- $\alpha$ A de boeuf (BOVIFN- $\alpha$ A) (figure 31). Ces résultats portent à croire que *hmf1* et *hmf2* puissent respectivement appartenir à un gène homologue à celui du PDGFr ou du BOVIFN- $\alpha$ A.

L'analyse des séquences montre certaines particularités. L'alignement nucléotidique suggère d'abord, pour *hmf2*, la présence d'un codon d'initiation en amont de l'ATG de l'interféron- $\alpha$ A. De même, les 69 premières bases du gène IFN codant pour le peptide signal de la protéine (Velan et al, 1985), appartiennent à une région de faible homologie relativement au reste de la séquence. Ces deux observations suggèrent une région N-terminale plus importante pour la protéine codée par le gène *hmf2*. De plus, tel qu'illustré aux figures 30 et 31, les extrémités de *hmf1* et *hmf2* incorporent les copies directe et complémentaire de l'oligonucléotide PKLS6. Ainsi, la séquence PKLS6 est utilisée comme amorce sens et antisens lors des amplifications PCR de *hmf1* et *hmf2* en s'hybridant à quatre régions distinctes du génome. Une hybridation imparfaite de l'amorce PKLS6, avec un ou plusieurs mauvais appariés



[Hmf2 ] ProArgGlyThrGly-AspProSerProGlyLeuGlyGlyCysGlnGluGlySerCysGly  
AGCCCAGAGGGACTGG-TGACCCTTCTCCTGGGCTGGGCGGGTGCCAAGAAGGTTCTGTGGT  
 \*\* \* \* \* \* \* \*\* \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*\* \* \* \* \*

[BOVIFN] CCCCATGGCCCCAGCCTGGTCCTTCTGCTATCCCTGTTGCTGC---TCAGCTGCAACGCCA

[Hmf2 ] GlyAlaSerValGlyLeuHisSerGlyArgAspArgHisProSerGlyTrpSerArgSerGly  
 GGGGCCAGCGTTGGGCTACATGATGGGAGGGACAGACACCCGAGCGGCTGGAGCAGGTCTGGG  
 \*\* \* \* \* \* \* \* \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \*\* \* \* \* \* \* \*

[BOVIFN] TCTGC--TCTCTGGGTTGCCACCTGCCTCACACCCACAGCCTGGCCAACAG-GAGGGTCTGA

[Hmf2 ] HisCysProGluAlaLeuArgGluGlyAlaAlaAlaAlaAlaSerProAlaGluAlaCysArg  
 CACTGTCCCAGGCATTGAGGGAAGGGGCCGAGCTGCAGCGAGTCCAGCCGAGGCCTGCAGG  
 \*\* \*

[BOVIFN] TGCTCCTGCAA-CAACTGAGAAGGGTCTCCCCTTCTC-CTGCCTGCAGGACAGAAATG-ACT

[Hmf2 ] LeuSerSerProGlyThrAlaValMetProSerHisSerGluGluLysGlyArgGluSerAla  
 CTGAGTTCCCCGGGCACAGCGGTGATGCCGAGTCACAGTGAGGAGAAGGGGAGGGAGAGTGCA  
 \*\* \*\*\*\*\* \*

[BOVIFN] TCGAATTCCTC-----CAGGAG-GCT-CTGGGTGGCAGCCAGTTGCA--GAAGGCTCAAGCCA

[Hmf2 ] -Leu-LeuLeu-Ser-AlaAla-GluMetGlyCysHisLeuProLeuGlyLeuValAlaLeu  
 -CT-TCTGCT-CA-GTGCTG-CCGAGATGGGGTGCCACCTGCCATTAGGTCTTGTGCTCTT  
 \*\* \*

[BOVIFN] TCTCTGTGCTCCACGAGGTGAACCAGCACACCTTCCAGCT--CTTCAGCACAGAGGGCTCGC

[Hmf2 ] Gln-LysGluGlyGlnGlyAlaProGlySerGlySerArgHisProArgGlu-Ala-GlnAla  
 CAG-AAGGAGGGACAAGGAGCTCCTGGAAGTGGCTCACGCCATCCCAGGGA-AGCC-CAGGCT  
 \* \* \* \* \* \*\*\*\*\* \*

[BOVIFN] CCGCCACGTGGGACAAGAGCCTCCTGG-ACAAGCTACGCGCTGCGCTGGATCAGCAGCTCACT

[Hmf2 ] AspLeuGlnGlyGlnProCysProGlyAlaGlyGlyCys-Ser-AlaProGlyCysValSer  
 GACCTGCAGGGTCAGCCTTGTCCCGAGCAGGAGGCTGC-AGT-GCTCCTGGGTGTGTGTCA  
 \*\*\*\*\* \*

[BOVIFN] GACCTGCA-AGCCTGTCTGACGCAGGAGGAGG-GGCTGCGAGGGGCTCCCCTGCTCAAGGAG

[Hmf2 ] ValValThrSerProSerGly  
GTGGTCACCAGTCCCTCTGGGCT  
 \* \* \* \* \* \* \* \*

[BOVIFN] GACTCCAGCCTGGTGTGAGGAAA

**FIGURE 31.** Séquence nucléotidique et acides aminés déduits du clone hmf2. La séquence est comparée à celle du gène de l'interféron- $\alpha$ A de boeuf (BOVIFN, Velan et al, 1985). Les nucléotides soulignés correspondent aux séquences directe et complémentaire de l'amorce PKLS6. Les symboles \* indiquent les positions communes aux deux séquences et des espaces (-) ont été introduits afin d'assurer leur alignement optimal.

ments, a cependant toutes les chances de se produire, étant donnée l'infime probabilité de retrouver plusieurs fois cette même séquence de 24 mères, dans le génome humain généré de façon aléatoire (Thein et Wallace, 1986).

## **3.2 Etudes génétiques des marqueurs *hmf1* et *hmf2***

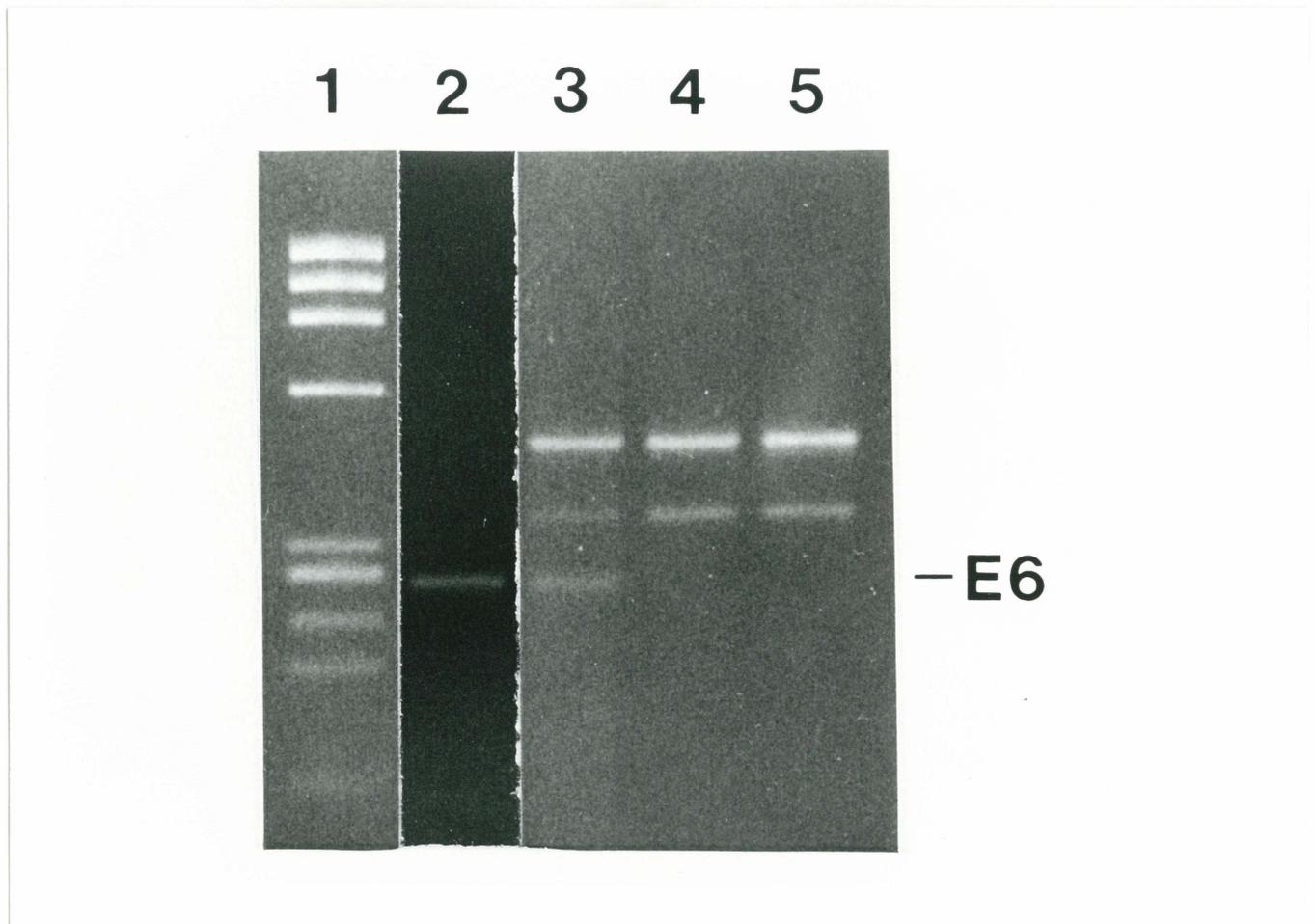
### **3.2.1 Détection des séquences *hmf1* et *hmf2* chez des individus normaux**

Les produits *hmf1* et *hmf2* sont obtenus par hybridation et extension de l'unique amorce PKLS6 (§ 3.1.2.2). Les conditions d'amplification PCR de l'exon 6 du gène PK-L ont été modifiées en éliminant du mélange réactionnel, l'oligonucléotide PKLA6 initialement utilisé en combinaison avec PKLS6. La figure 32 compare les produits PCR générés chez un individu normal (H.B.) et un patient anémique (A.C.) en présence et en absence de l'oligonucléotide PKLA6. Par opposition aux réactions PCR amorcées par le couple PKLS6-PKLA6, les amplifications amorcées par l'unique oligonucléotide PKLS6 engendrent les séquences *hmf1* et *hmf2* à la fois chez des sujets anémiques et normaux. Tel que décrit à la section suivante, nous proposons l'hypothèse d'un réarrangement des gènes *hmf1* et *hmf2* pour expliquer ces résultats.

### **3.2.2 Réarrangement des gènes *hmf1* et *hmf2***

#### **3.2.2.1 Amplification du gène *hmf2***

La séquence *hmf2* marquée a servi aux analyses "Southern blots" d'ADN génomique lymphocytaire de sujets normaux (E.d.M. et A.L.) et d'un patient anémique (ME.Du.). Un volume de sang restreint pour l'enfant malade a permis l'isolement d'au plus 0,5 $\mu$ g d'ADN; un matériel génétique dix fois plus abondant



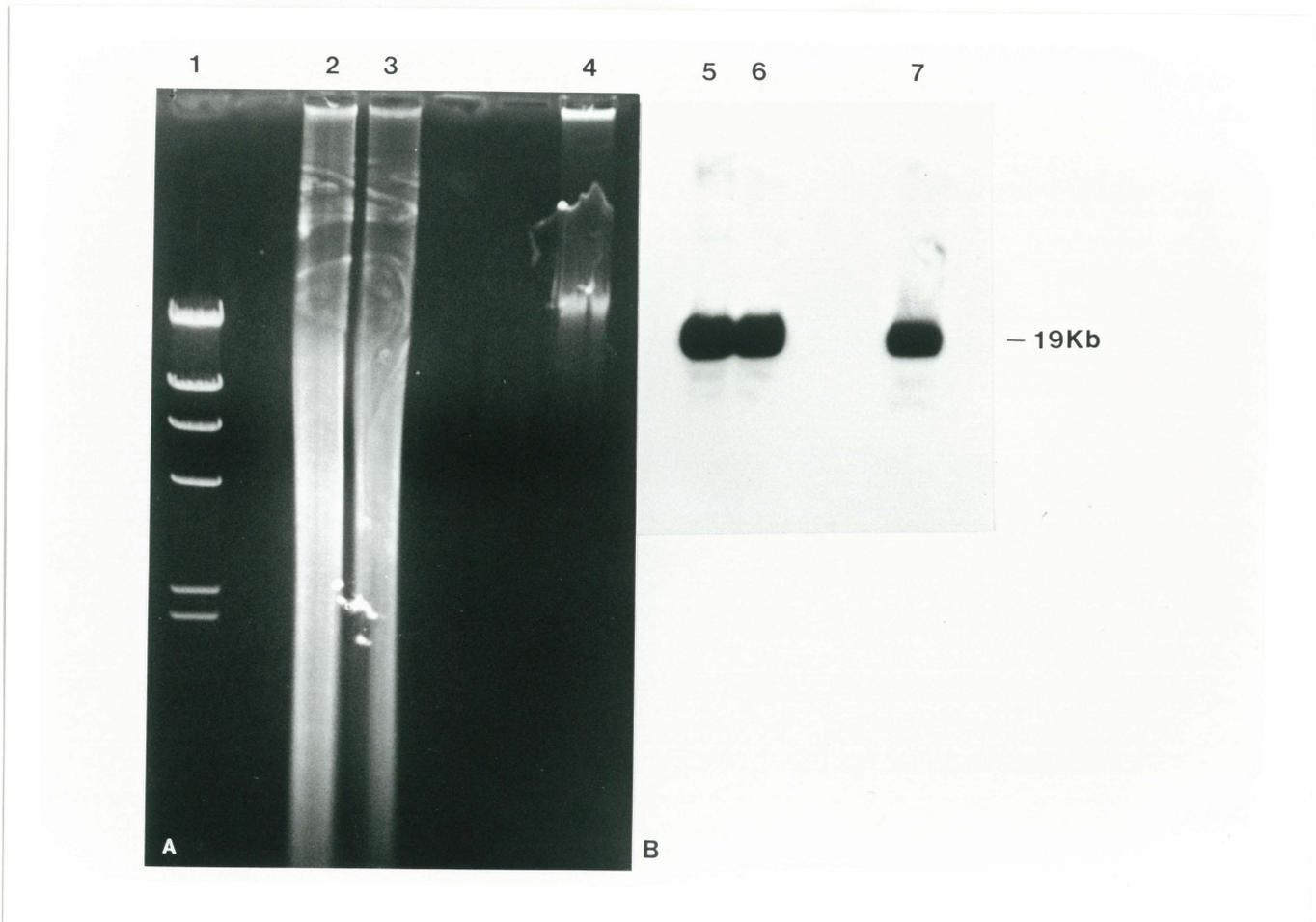
**FIGURE 32.** Détection des séquences *hmf1* et *hmf2* chez des individus normaux et anémiques. Les réactions PCR ont été effectuées comme décrit à la figure 26, en présence du couple PKLS6-PKLA6 (piste 2 et 3) ou en utilisant l'unique amorce PKLS6 (pistes 4 et 5). Un exemple est présenté pour un sujet contrôlé (H.B.; pistes 2 et 4) et un patient anémique (A.C.; pistes 3 et 5). Les produits PCR sont visualisés sur gel d'agarose NuSieve GTG 4% en présence du marqueur de poids moléculaires  $\phi$ X-174 RF HaeIII (piste 1). Les positions des fragments correspondant à l'exon 6 du gène PK-L sont désignées par l'abréviation E6.

( $\sim 5\mu\text{g}$ ) était cependant disponible pour les sujets adultes normaux. Ces quantités d'ADN ont été digérées par l'enzyme EcoRI, fractionnées par électrophorèse (figure 33.A), transférées sur membrane de nylon et hybridées avec la sonde *hmf2* (figure 33.B). En dépit d'une quantité d'ADN initialement réduite pour ME.Du., des bandes d'intensité équivalente ont été observées à 19Kb chez les 3 individus, suggérant une amplification d'environ 10 fois du gène *hmf2*, chez le patient hémolytique (fig.33.B).

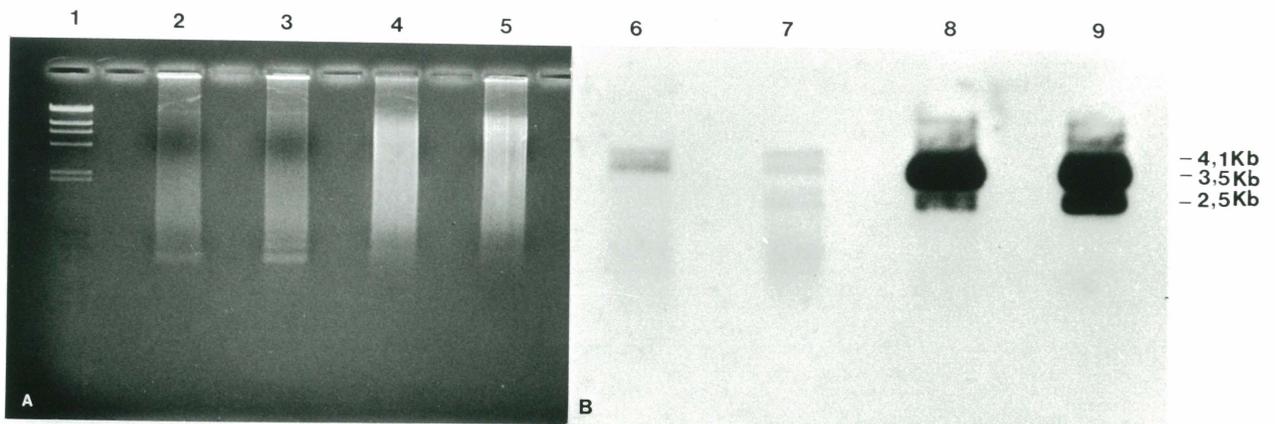
Ainsi, l'apparition spécifique du produit *hmf2* lors de l'amplification PCR de l'exon 6 du gène PK-L des sujets atteints, est possiblement dû à la présence compétitrice d'un nombre de copies accru du gène *hmf2* dans leur génome lymphocytaire. Chez les individus normaux, en éliminant l'oligomère PKLA6 du mélange réactionnel, l'exon 6 n'est plus produit et l'amorce PKLS6 disponible peut s'hybrider au gène *hmf2*.

### 3.2.2.2 Réarrangement du gène *hmf1*

Des analyses par buvardage de type "Southern" ont également été réalisées avec la sonde *hmf1*. Les études ont utilisé des quantités d'ADN génomique inégales digérées par les enzymes de restriction HindIII et EcoRI:  $\sim 0,5\mu\text{g}$  et  $\sim 5\mu\text{g}$  d'ADN étaient respectivement disponibles pour le patient anémique A.C. et l'individu contrôle E.d.M. (figure 34.A). Par opposition aux résultats obtenus avec le marqueur *hmf2*, mais en corrélation avec les quantités d'ADN initialement employées, des signaux d'intensité 10 fois inférieure ont été produits chez le sujet anémique, témoignant d'un nombre de copies non augmenté du gène *hmf1* (figure 34.B). L'autoradiogramme suggère cependant un réarrangement d'ADN à proximité du marqueur géné-



**FIGURE 33.** Analyse par "Southern blot" du marqueur génétique *hmf2*. A. Electrophorèse sur gel d'agarose 0,7% d'ADN génomique lymphocytaire digéré par l'enzyme *EcoRI*. Pistes 2 et 3: 5 $\mu$ g d'ADN d'individus contrôles (E.d.M. et A.L., respectivement); piste 4: 0,5 $\mu$ g d'ADN d'un sujet anémique (ME.Du.). B. Hybridation de la sonde *hmf2* à un fragment d'environ 19Kb. Les pistes 5, 6 et 7 correspondent aux puits 2, 3 et 4. Le marqueur de poids moléculaires  $\lambda$ HindIII a été utilisé (piste 1).



**FIGURE 34.** Analyse par "Southern blot" du marqueur génétique *hmf1*. A. Electrophorèse sur gel d'agarose 0,7% d'ADN génomique lymphocytaire digéré par les enzymes *EcoRI* (pistes 2 et 4) et *HindIII* (pistes 3 et 5). Pistes 2 et 3: 0,5 $\mu$ g d'ADN d'un patient anémique (A.C.); pistes 4 et 5: 5 $\mu$ g d'ADN d'un sujet contrôle (E.d.M.). B. Hybridation de la sonde *hmf1* à des fragments de 2,5Kb, 3,5Kb et/ou 4,1Kb. Les pistes 6 à 9 correspondent aux pistes 2 à 5. Le marqueur de poids moléculaires  $\lambda$ *HindIII* a été utilisé (piste 1).

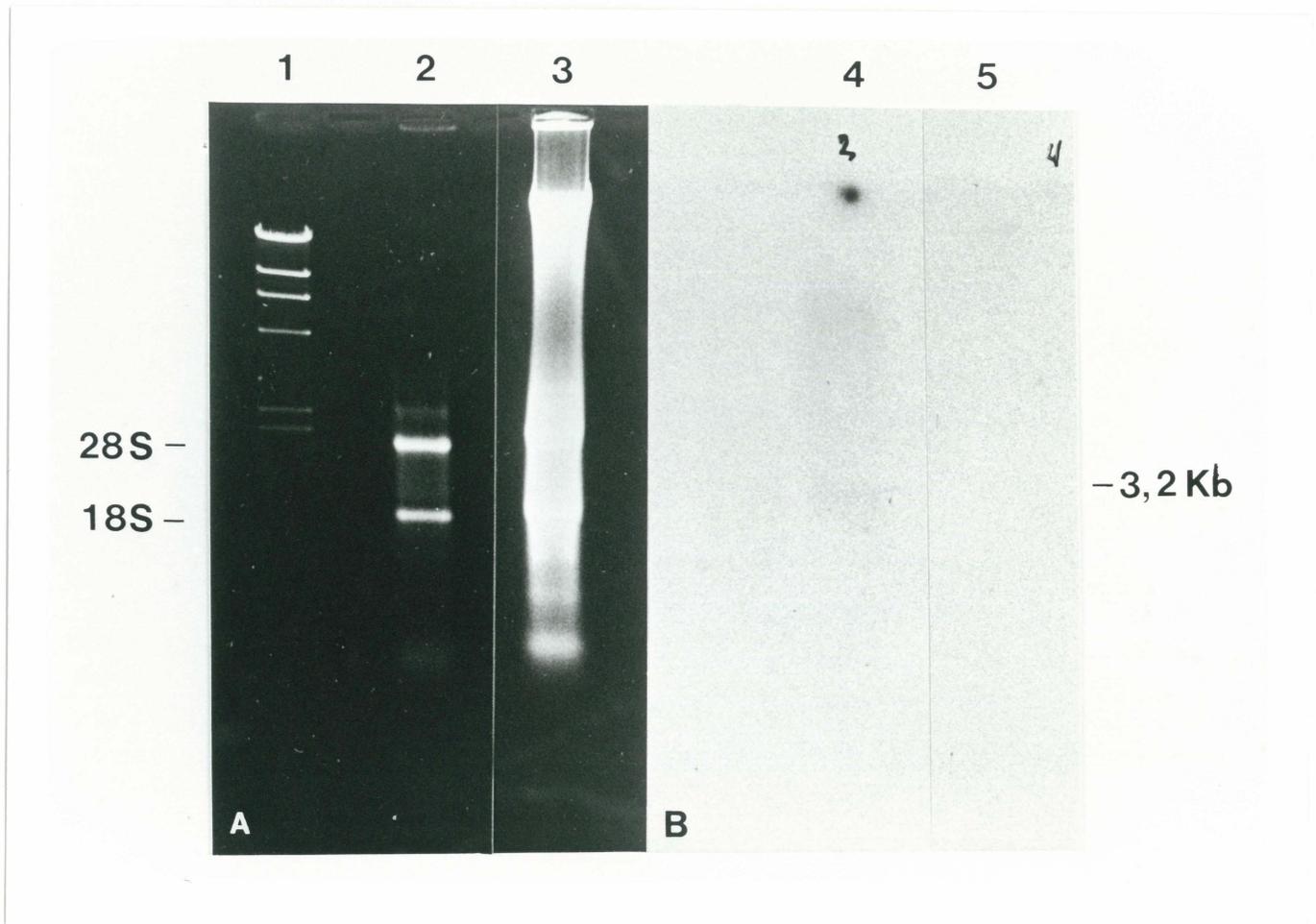
tique *hmf1*. En effet, les bandes observées à 2,5 et 3,5Kb chez les individus normaux, apparaissent plutôt à 3,5 et 4,1Kb chez le patient A.C.

Les sondes *hmf1* et *hmf2* comptent respectivement 350 et 450pb. L'amorce PKLS6 (21 nucléotides) ne représente qu'environ 10% des séquences *hmf1* et *hmf2*. Pour cette raison, la probabilité d'hybridation des sondes *hmf1* et *hmf2* à l'exon 6 du gène PK-L est faible relativement à leur hybridation aux putatifs gènes correspondants. Ainsi, les buvardages de type "Southern" décrits aux figures 33 et 34 ont peu de chances de révéler la présence du gène PK-L.

### 3.3 Analyse de l'expression des gènes *hmf1* et *hmf2*

Les patrons d'expression des gènes *hmf1* et *hmf2* ont été caractérisés par buvardages de type "Northern" de lymphocytes sains, d'un foie et d'intestins foetaux normaux. Tel qu'illustré à la figure 35, la sonde *hmf2* hybride à un ARNm lymphocytaire de 3,2Kb, à mi-chemin entre les bandes caractéristiques des ARN ribosomiaux 28S (4,72Kb) (Chan et al, 1983) et 18S (1,87Kb) (Chan et al, 1984). Le même signal de faible intensité est également perçu en utilisant les ARN hépatiques et intestinaux (résultats non montrés). L'analyse "Northern" ne détecte cependant aucune bande à partir des ARN totaux d'un tissu contrôle (surrénales de poulet). Le résultat est davantage significatif compte tenu de l'abondance des ARN surrénaux de poulet utilisés relativement aux ARN lymphocytaires humains présents (fig. 35.A).

Les mêmes études ont été réalisées avec la sonde *hmf1*; nos résultats (non présentés) révèlent l'absence d'un signal pour chaque tissu analysé.



**FIGURE 35.** Analyse de l'expression du gène *hmf2* par buvardage de type "Northern".  
**A.** Electrophorèse sur gel d'agarose 0,7% d'ARN totaux isolés de lymphocytes sains (piste 2) ou de surrénales de poulet (piste 3). **B.** Hybridation de la sonde *hmf 2* à un fragment de 3,2Kb. Les pistes 4 et 5 correspondent aux pistes 2 et 3. Le marqueur de poids moléculaires  $\lambda$ HindIII a été utilisé (piste 1).

# DISCUSSION

---

## 1. Etude du gène PK-L et de la déficience en PK-R

### 1.1 Mutation de régulation

La déficience en pyruvate kinase de type R (PK-R) est la plus commune des enzymopathies génétiquement transmises de la voie d'Embden-Meyerhof chez l'humain. L'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire (AHCNS) a été documentée chez un nombre important de sujets ayant hérité de gènes PK défectueux. La compréhension moléculaire de cette pathologie héréditaire monogénique a récemment progressé avec l'accès aux séquences nucléotidiques des ADNc des isoenzymes PK-L (Tani et al, 1988) et PK-R (Kanno et al, 1991), préluce indispensable à l'identification des lésions génomiques sous-jacentes à l'affection.

Trois mutations ponctuelles ont depuis peu été rapportées. Kanno et al (1991), Neubauer et al (1991) puis Kanno et al (1992) ont identifié, à l'exon 8 du type PK-R, la substitution  $^{384}\text{Thr} \rightarrow \text{Met}$ , chez trois individus d'origine familiale ou ethnique différente (PK-Tokyo, PK-Beirut et PK-Nagasaki). L'altération protéique résulte d'une transition nucléotidique ( $^{1151}\text{ACG} \rightarrow \text{ATG}$ ), affectant un résidu conservé de la 7<sup>e</sup> hélice  $\alpha$  du domaine A, impliqué dans la liaison des ions  $\text{K}^+$ .

Il est intéressant d'observer l'apparition indépendante d'une mutation identique au sein d'ethnies distinctes. Il est risqué d'en déduire des conclusions quant aux migrations des populations; le résultat peut s'interpréter à la lumière de l'hypothèse

des points chauds de mutations selon laquelle les 5-méthylcytosines sont instables et tendent à se désaminer, transformant, comme c'est le cas ici, une cytosine (C) en thymidine (T) (Youssoufian et al, 1986). Kanno et al (1992) favorisent plutôt une troisième hypothèse situant la survenue de cette mutation bien avant la divergence raciale entre les peuples libanais et japonais, supposant, du même coup, l'origine évolutionnaire commune des patients.

Une seconde transition C → T en position 487 de l'ADNc PK-R (exon4) a été identifiée; elle provoque l'altération de l'arginine 163 (CGC) en cystéine (TGC) chez un patient turc sévèrement atteint, PK-Linz (Neubauer et al, 1991). L'acide aminé touché réside au site actif de l'enzyme.

Plus récemment, Kanno et al (1992) ont montré la substitution <sup>421</sup>Gln → Lys chez deux patients asiatiques sans liens parentaux, PK-Fukushima et PK-Maebashi. Le remplacement des acides aminés est la conséquence d'une transversion nucléotidique (CAG → AAG) à l'exon 8 de l'isoenzyme PK-R, affligeant le baril β du domaine A central, à proximité du site de liaison K<sup>+</sup>.

Ainsi, deux mutations ont été mises à jour dans l'exon 8 de l'isoenzyme érythrocytaire. Cette observation suggère l'importance fonctionnelle, pour l'activité PK, de la portion protéique codée par l'exon 8. Des études structurales des variants PK-R clarifieraient davantage les relations structure-fonction de l'enzyme.

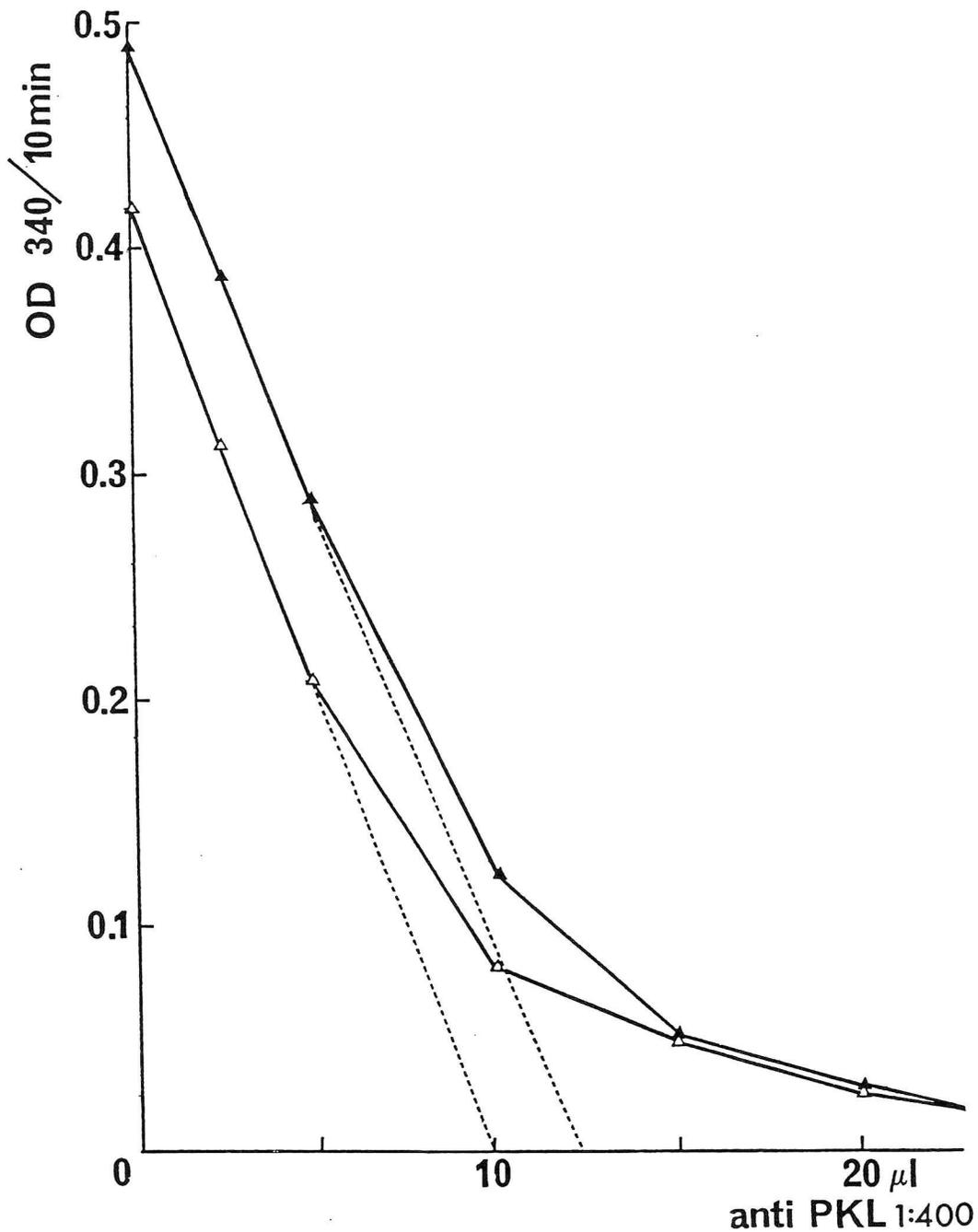
Un registre complet des patients Québécois déficients en pyruvate kinase érythrocytaire a récemment été construit. Des études épidémiologiques ont révélé une prévalence de la maladie plus élevée au Nord-Est de la province, laissant supposer

l'existence d'une mutation typiquement Québécoise (de Médicis et al, 1992). La présence d'une mutation originale ou déjà décrite a été scrutée pour le cas du patient A.C. Né à Québec en 1985, l'enfant présente un phénotype sévère. Son activité PK-R n'est que ~20% de l'activité normale (tableau 5) et sa condition hémolytique l'assujettit à des transfusions sanguines périodiques depuis la naissance. L'enfant, issu d'une union non-consanguine, possède peut-être un génotype hétérozygote composé pour les allèles PK mutantes. Ce variant a été désigné PK-Québec.

Nous avons séquencé la région codante et certains introns (1, 3, 5 et 8) de la pyruvate kinase R du sujet A.C. Aucune délétion, insertion ou mutation ponctuelle spécifique pour ce patient et responsable de la déficience enzymatique n'a été identifiée.

Parallèlement aux études génétiques, des analyses cinétiques et immunologiques du variant PK-Québec, ont été poursuivies dans le laboratoire du Dr E. de Médicis. Les enzymes PK-R normal et mutant (PK-Québec) ont été immunoprécipités en présence d'un antisérum spécifique humain anti-PKL. Tel qu'illustré à la figure 36, le produit du gène PK-L est immunologiquement reconnaissable et donc structurellement normal dans les réticulocytes du patient A.C.

Les propriétés cinétiques de l'enzyme partiellement purifié sont résumées au tableau 11. L'activité enzymatique totale, dosée selon les recommandations du Comité International pour la Standardisation en Hématologie (Miwa et al, 1979), indique des niveaux d'expression PK-R dramatiquement réduits (tableaux 5 et 11). L'immunoprécipitation a permis la détermination, pour PK-Québec, d'une activité



**FIGURE 36.** Immunoprécipitation de la pyruvate kinase érythrocytaire. Des quantités fixes de l'enzyme partiellement purifié ont été traitées avec des quantités croissantes d'antisérum anti-PKL (1:400), et l'activité PK a été mesurée dans le surnageant (Staal et al, 1982).  $\Delta$  10 $\mu$ l d'enzyme PK-R de l'individu normal.  $\blacktriangle$  10 $\mu$ l d'enzyme PK-R de l'individu normal combinés à un même volume d'enzyme PK-Québec.

TABLEAU 11. PARAMETRES CINETIQUES DE LA PK-R PARTIELLEMENT PURIFIEE

Propriétés	Paramètres (unités)	Sujet normal	A.C.
Activité enzymatique dans les GR*	EU/gHb	4,9	0,98
Activ. spécif. (immunoprécipit.)	% du contrôle	100	100
Affinité pour le PEP	K <sub>0,5</sub> (mM)	0,45	0,54
	K <sub>M</sub> (mM)	0,47	0,43
Coefficient de Hill	n <sub>H</sub>	1,60	1,22
Affinité pour l'ADP	K <sub>M</sub> (mM)	0,179	0,198
Spécificité nucléotidique	Taux % de ADP		
	UDP	71	48,3
	GDP	83	72,4
	CDP	14	12,9
Stabilité	% activité après 24 heures à 4°C	87	45

\* L'activité enzymatique a été déterminée en utilisant un hémolysat brut dialysé et normalisé contre la concentration en hémoglobine (Hb) dans l'hémolysat. Tous les autres paramètres cinétiques ont été déterminés avec l'enzyme partiellement purifié par précipitation fractionnelle au sulfate d'ammonium et délipidation (Miwa et al, 1979). Les courbes de saturation pour l'ADP et le PEP, de même que la spécificité nucléotidique ont été déterminées à 25°C. Deux valeurs sont rapportées pour la description de l'affinité du PEP: K<sub>0,5</sub> est la valeur de la concentration en PEP à la moitié de la vitesse maximale, et K<sub>M</sub> est la constante d'affinité réelle calculée selon l'équation de Hill:

$$\log \left( \frac{v}{V-v} \right) = -\log K_M + n \log S.$$

L'identification de l'isoenzyme PK-R et de son activité spécifique ont été permis par utilisation d'un antisérum monospécifique de lapin dirigé contre l'isoenzyme PK-L humain purifié (un don du Dr A. Kahn, Paris, France).

spécifique immunologique normale, telle que définie par le rapport de l'activité précipitée au nombre de molécules immunologiquement détectables. Une valeur d'activité spécifique normale associée à un enzyme faiblement exprimé, témoigne souvent d'une instabilité protéique menant à une dégradation accélérée. D'ailleurs, l'incubation du variant PK-Québec à 4°C pendant 24 heures conduit à un abaissement important de sa stabilité enzymatique, compromettant, *in vivo*, l'intégrité des globules rouges. Tous les paramètres concernant le site actif (l'activité spécifique, mais aussi la liaison des substrats et la spécificité nucléotidique) suivent les valeurs standards, telles que définies chez un individu normal. Le coefficient de Hill est faiblement abaissé, indiquant un affaiblissement possible des interactions allostériques entre les sous-unités de l'enzyme tétramérique.

A.C. présente ainsi un enzyme PK-R faiblement exprimé, instable et caractérisé par un coefficient de Hill légèrement altéré. L'allostérie et la stabilité d'un enzyme constituent des propriétés pouvant dépendre de la dilution enzymatique. Ainsi, leur altération pourrait résulter du faible niveau d'expression d'un enzyme autrement normal.

La convergence des études cinétiques, immunologiques et génétiques permet de spéculer quant à la nature des mutations génomiques responsables du déficit en pyruvate kinase érythrocytaire chez l'individu A.C. Les acquis de ces différentes analyses suggèrent l'existence d'une anomalie génétique portant sur les séquences régulatrices du gène PK-L.

Certaines questions résistent à la vérification de cette hypothèse d'une mutation

de régulation chez l'individu A.C. D'abord, la démonstration d'une lésion génétique dans la région 5' flanquante du gène PK-L repose sur l'identification préalable des séquences régulatrices; clonées chez le rat (Cognet et al, 1987; Noguchi et al, 1987), elles demeurent cependant inconnues chez l'humain.

Nous devons également considérer une faible probabilité théorique résiduelle qu'une mutation structurale, responsable du déficit en PK-R, existe au niveau des régions codantes impliquées dans la liaison des amorces d'amplification PCR. En effet, l'hybridation d'un oligonucléotide de synthèse à un site ponctuellement muté du gène, conduirait au mauvais appariement d'une base unique, un phénomène masquant l'anomalie génétique en ce point sans altérer l'efficacité de la réaction PCR. L'utilisation de paires alternatives d'amorces donnera accès à ces régions; les travaux sont en cours dans le laboratoire du Dr E. de Médicis.

A l'image des autres érythroenzymopathies glycolytiques, les différents cas rapportés de déficience en pyruvate kinase érythrocytaire semblent majoritairement impliquer une anomalie génétique structurale. Certains mutants régulateurs ont néanmoins été rapportés. Les déficiences en pyruvate kinase dites "classiques" sont caractérisées par une absence complète d'enzyme PK-R, l'activité PK des globules rouges, résultant d'une compensation par l'isoenzyme PK-M<sub>2</sub> (Wallace et Miyada, 1989). Une telle compensation est inexistante chez A.C.; tel que représenté à la figure 36, l'antisérum anti-PKL précipite complètement l'activité PK des hématies du patient. De plus, la détection d'une activité PK-R résiduelle est peut-être artéfactuelle. On se souvient en effet des besoins transfusionnels du patient A.C. A intervalles

de 3 ou 4 semaines, 200ml d'un culot globulaire déleucocyté lui sont infusés. Les globules rouges normaux transfusés, poursuivant un périple de quelque 120 jours à travers l'organisme du patient, il devient difficile, lors du dosage de l'activité PK, de discriminer entre l'activité enzymatique réelle et celle issue de la transfusion. Ainsi, les analyses cinétiques révèlent possiblement la réduction d'une biosynthèse protéique PK-R, en fait totalement supprimée.

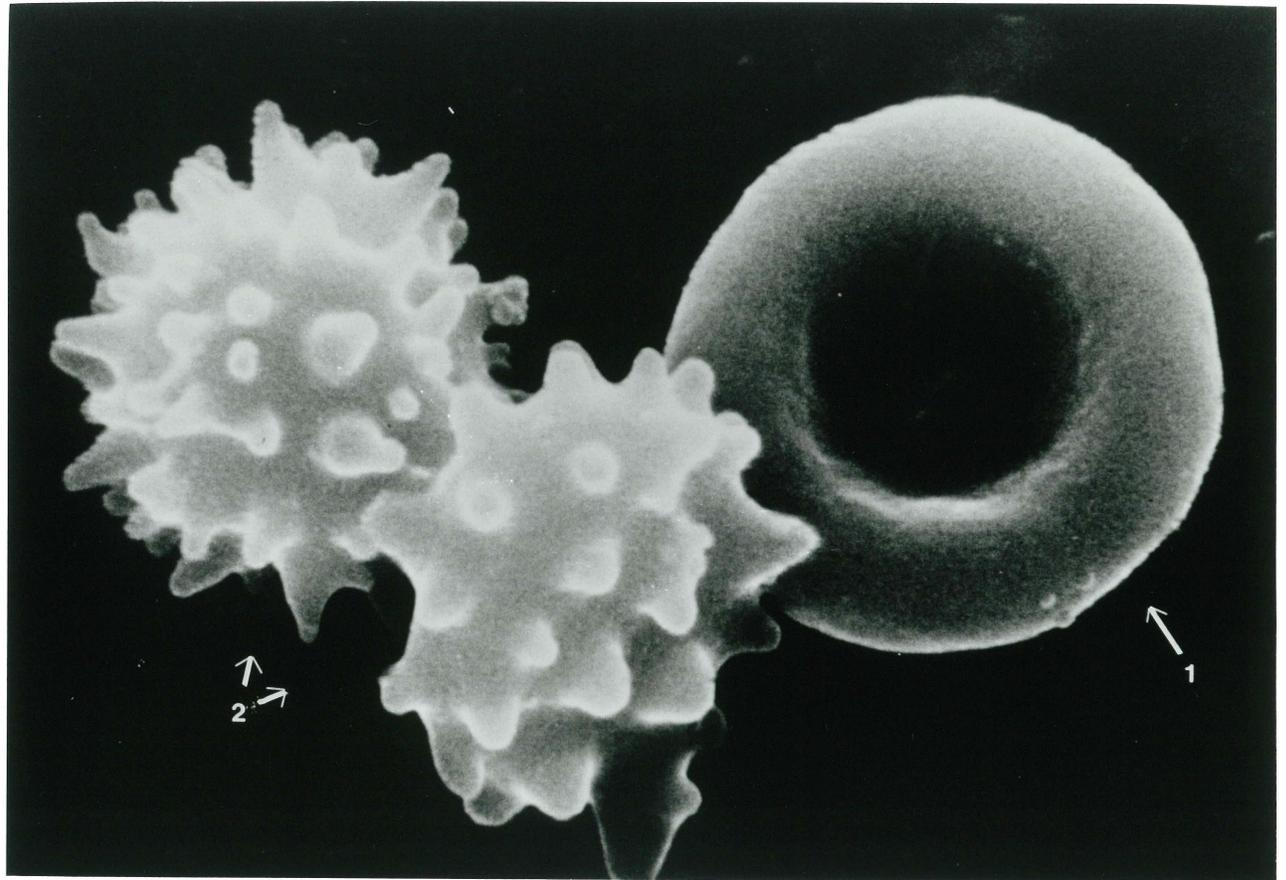
Le déficit en pyruvate kinase érythrocytaire apparaît cliniquement hétérogène; alors que certains sujets présentent, dès l'enfance, des complications mettant en jeu le pronostic vital, d'autres n'ont aucune manifestation fonctionnelle. Plusieurs scénarios ont déjà été envisagés pour corrélérer les propriétés moléculaires des variants PK-R et la sévérité pathologique.

L'absence d'une étroite relation entre les degrés de déficience en pyruvate kinase érythrocytaire et la sévérité des symptômes hémolytiques a été soulignée par nombre d'auteurs (Boivin, 1971; Boivin et al, 1972; Miwa et Nishina, 1974; Paglia et al, 1968; Kahn et al, 1981). Cette observation a conduit certains investigateurs à proposer l'association du déficit en pyruvate kinase à un autre désordre métabolique basal, localisé dans les membranes érythrocytaires (Zanella et al, 1978), les systèmes de régénération d'ATP (Guminska et Wazewska-Czykewska, 1979; Schröter, 1972) ou les systèmes responsables du maintien de l'équilibre oxydo-réducteur (Van Berkel et al, 1973; Zanella et al, 1976). Une autre possibilité soulevée expliquait la déficience en PK-R par des altérations multigéniques, l'hémolyse résultant d'une combinaison de plusieurs facteurs (Zuelzer et al, 1968). Enfin, Kahn et al (1981) ont évoqué

certaines caractéristiques cinétiques de l'enzyme, notamment l'activité résiduelle, l'affinité pour le substrat phosphoénolpyruvate et l'activateur allostérique fructose-1,6-diphosphate, et l'inhibition par l'ATP.

Dans notre étude, la condition hémolytique sévère du patient A.C. corrèle avec une faible activité enzymatique PK-R résiduelle. L'absence d'une compensation par l'isoenzyme PK-M<sub>2</sub> est peut-être responsable de la sévérité clinique du malade. La caractérisation récente de plusieurs mutations semble indiquer l'existence d'un nombre restreint d'allèles anormales, et la nature de l'anomalie, contrairement au degré du déficit en PK-R pourrait jouer un rôle systématique dans la sévérité de l'affection. Les phénotypes cliniques engendrés par le mutant de régulation PK-Québec et le variant atteint en son site actif, PK-Linz, apparaissent plus sérieux que les phénotypes provoqués par PK-Tokyo (ou PK-Beirut ou PK-Nagasaki) et PK-Fukushima (ou PK-Maebashi) (Neubauer et al, 1991; Kanno et al, 1991; Kanno et al, 1992). Cependant, la même mutation chez différents patients résulte en des niveaux variables de déficience en pyruvate kinase érythrocytaire (Kanno et al, 1992).

La forme biconcave des globules rouges humains, résultat d'un fragile équilibre de forces, est susceptible aux changements dans nombre de circonstances pathologiques. Parmi les caractéristiques proéminentes des anémies hémolytiques congénitales non sphérocytaires, les anomalies morphologiques des érythrocytes sont généralement peu considérées. Pourtant, l'analyse, par microscopie électronique à balayage, des hématies du patient A.C., révèle une forte proportion de cellules présentant l'aspect d'une sphère hérissée de projections épineuses (figure 37). Cette variété



**FIGURE 37.** Photomicrographie électronique à balayage d'un échantillon sanguin frais prélevé chez A.C. La figure compare l'aspect morphologique d'un globule rouge normal (1) et d'échinocytes (2). (Photomicrographie électronique réalisée par Dr Rinaldo de Médicis, Université de Sherbrooke).

d'érythrocytes spiculés est désignée échinocytes ("cellules en oursins") ou cellules en épines (Brecher et Bessis, 1972). Ces hématies anormales se caractérisent par des spicules nombreux, régulièrement espacés et de taille uniforme. Les échinocytes ressemblent beaucoup aux cellules crénelées qui ne sont que des artéfacts expérimentaux. Globalement, la présence d'échinocytes est un phénomène rare, *in vivo*, en dehors de la période néonatale (Feo et al, 1978).

Cette transformation discocyte (nom tiré de l'aspect en disque biconcave des GR normaux)-échinocyte s'observe lorsque l'adénosine triphosphate (ATP) intracellulaire diminue (Nakao et al, 1959), lorsque le calcium intracellulaire augmente (White, 1976), lorsque la cellule est incubée dans du plasma conservé à pH élevé en présence de détergents anioniques, de lysolécithine ou d'acides gras, ou lorsque les cellules sont lavées et placées entre une lame et une lamelle de verre (et non de plastique) (Ponder, 1948).

La transformation en échinocytes se produit en plusieurs stades discernables à la figure 38 (Bessis, 1972): le disque biconcave adopte d'abord une forme irrégulière (échinocyte I); puis des échancrures apparaissent (projections régulièrement espacées) (échinocyte II); puis la cellule devient ovoïde ou sphérique recouverte d'une trentaine de spicules régulièrement espacés se projetant de la surface (échinocyte III); la cellule devient alors nettement sphérique, recouverte d'infimes spicules (sphéro-échinocytes). Ce dernier stade, contrairement aux précédents, est irréversible et parfois considéré comme un état sphérique "pré-lytique".

La présence de cellules spiculées a été rapportée par Oski et al (1964), chez un



**FIGURE 38.** Photomicrographie électronique à balayage d'un échantillon sanguin frais prélevé chez A.C. La figure permet de distinguer des hématies à différents stades de leur transformation discocyte-échinocyte: 1- échinocyte I; 2- échinocyte II; 3- échinocyte III; 4- sphéro-échinocyte. (Photomicrographie électronique réalisée par Dr Rinaldo de Médicis, Université de Sherbrooke).

patient caractérisé, comme l'individu A.C., par une déficience profonde en pyruvate kinase érythrocytaire (~15% de l'activité normale) et une condition hémolytique sévère avec besoins de transfusions sanguines répétées. De plus, l'observation par microscopie électronique d'un échantillon sanguin frais d'un patient phénotypiquement moins atteint, révèle une proportion plus importante d'hématies normales, et les globules rouges anormaux présentent un aspect morphologique distinct de celui des échinocytes observés chez A.C. (résultats non montrés). Cette observation suggère une corrélation possible entre le type morphologique des érythrocytes altérés, la profondeur de l'expression pathologique et, par extension, la nature de la mutation responsable du phénotype.

## **1.2 Erreurs versus polymorphismes**

Une portion majeure du processus de recherche de la mutation PK chez l'individu A.C. a impliqué l'analyse par séquençage des régions codantes et introniques du gène PK-L, et la comparaison de l'information avec les séquences obtenues chez un sujet contrôle. Cette étude a permis d'identifier, chez l'individu normal et anémique, plusieurs positions nucléotidiques différant de la séquence PK-R acceptée (Tani et al, 1988; Kanno et al, 1991), soulevant à chaque fois l'épineuse question des erreurs versus polymorphismes.

Le problème concerne d'abord la difficulté à discerner un polymorphisme naturel d'une erreur de séquençage. De telles erreurs sont introduites dans les cas impliquant le clonage de fragments amplifiés par PCR (figures 20.B, 20.C et 20.D), ou suite à

l'interprétation inexacte d'un autoradiogramme (figure 21.A). La stratégie du séquençage direct a été employée, dans certaines circonstances, pour éviter les erreurs secondaires aux incorporations de bases mal appariées par la polymérase de *Thermus aquaticus* et, du même coup, minimiser les risques de confusion avec un polymorphisme naturel.

Nous estimons à environ 1/400 la fréquence des résidus incorporés de façon aberrante, une valeur comparable à celle constatée par Tindall et Kunkel (1988). Les erreurs sont cependant réparties au hasard, chacune d'entre elles n'intéressant qu'une partie infime de la population amplifiée. Ainsi, une séquence nucléotidique déterminée sur la population dans son ensemble donnera, à chaque position, la base présente au niveau d'environ 399 fragments sur 400, soit la base réellement présente dans l'ADN d'origine (Kahn, 1988).

La notion d'erreur concerne également la présence éventuelle de nucléotides faussement rapportés dans la séquence PK-L publiée (Tani et al, 1988). Quatre variants non pathologiques ont été détectés aux exons 4, 8 et 11 (figure 22).

Le site polymorphe 569 (exon 11) a été identifié, chez certains orientaux, par des investigateurs japonais (Kanno et al, 1992), puis confirmé dans notre laboratoire à partir du matériel génétique d'un sujet Vietnamien (T.L.N.) (tableau 4) établi en Estrie. Aucun des deux Canadiens étudiés (l'un normal, l'autre malade), ne présentait la variation, suggérant, pour ce variant, une hétérogénéité allélique spécifique aux populations orientales. Des études inter-ethniques de plus grande envergure pourraient confirmer cette spécificité.

Au contraire, les altérations de séquences aux exons 4 et 8 du gène PK-L (positions 130, 131 et 423, figure 22) ont systématiquement été décelées chez les cinq individus Canadiens, normaux ou anémiques, sélectionnés pour l'étude. Le faible nombre de sujets inclus dans notre analyse ne permet pas de conclure avec certitude quant à la nature artéfactuelle ou polymorphe de ces variants PK-R. Certaines évidences favorisent pourtant la première alternative.

En comparant les séquences PK-R humaines altérées avec les nucléotides et acides aminés correspondants du gène PK-L du rat, on retrouve, chez le rat, les séquences identiques à celles des 3 variants non pathologiques identifiés chez l'humain. Ainsi, en raison de la forte homologie des gènes PK-L des deux espèces (86,9% au niveau nucléotidique et 92,4% au niveau des acides aminés; Tani et al, 1988), cette observation accomode davantage l'hypothèse d'erreurs au niveau des séquences publiées.

De plus, les travaux de Neubauer et al (1991) fournissent un argument supplémentaire, celui de la conservation inter-ethnique des séquences altérées. Les auteurs rapportent en effet les mêmes variations nucléotidiques chez neuf individus dont les variants PK-Linz, d'origine turque, et PK-Beirut, d'origine libanaise.

### **1.3 Promoteur PK-L humain: identification d'éléments régulateurs**

Les ADNc des isoenzymes PK-L et PK-R humains ont été clonés et séquencés (Tani et al, 1988; Kanno et al, 1991). Chez le rat, la séquence du gène complet de la

pyruvate kinase de type L est connue (Noguchi et al, 1987; Cognet et al, 1987). Elle contient deux promoteurs alternatifs espacés de 500pb, l'un spécifique au foie (promoteur PK-L), l'autre aux cellules érythrocytaires (promoteur PK-R) (figure 2.A). Le promoteur PK-L n'est pas uniquement spécifique à la différenciation hépatique, il constitue également un système précisément contrôlé par des hormones et la diète. Vaultont et al (1986) ont montré, *in vivo*, la stimulation du gène PK-L par le glucose et l'insuline, et son inhibition par le glucagon via l'AMP cyclique.

Le gène PK-L du rat est sous le contrôle d'au moins trois éléments régulateurs actifs en cis (figure 25): PKL-I (ou L1), PKL-II (ou L3) et PKL-III (ou L4) (Vaultont et al, 1989; Yamada et al, 1990). Ces cis-activateurs sont en mesure de capter des facteurs diffusibles actifs en trans. Chez le rat, PKL-I (ou L1) contient une séquence palindrome (5'-CTGGTTATACTTAACCAG-3') présentant une homologie avec le site de liaison du facteur de transcription LF-B1 ("liver specific factor B1"). Le motif PKL-II (ou L3) inclut la séquence 5'-TTCCTGGACTCTGGCCCCAGTGT-3', similaire au site de liaison d'un second facteur de transcription spécifique au foie, LF-A1. L'élément PKL-III (ou L4) contient également une séquence palindrome (5'-CCACGGGGCAGTCCCGTGG-3') homologue au site de liaison d'un facteur de transcription ubiquitaire, le MLTF ("major late transcription factor"). Vaultont et al (1989) ont aussi identifié un élément régulateur (L4) capable de lier le facteur nucléaire ubiquitaire NF1; son rôle s'est pourtant avéré négligeable dans le contrôle de la spécificité tissulaire de l'expression du gène PK-L (Cognet et al, 1991). Ces auteurs proposent plutôt l'implication du NF1 au niveau de l'ouverture de la structure

chromatinienne lors de l'activation du promoteur PK-L.

Des séquences fortement homologues aux éléments régulateurs PKL-I , PKL-II et PKL-III du promoteur L chez le rat ont été reconnues en des positions correspondantes du promoteur PK-L humain (figure 25). Cette conservation des séquences entre espèces suggère un mode de contrôle similaire de la spécificité hépatique de l'expression du gène PK-L. Le mécanisme par lequel la liaison des facteurs LF-B1 , LF-A1 et MLTF résulte en un patron d'expression spécifique, est peu connu. La proximité des éléments PKL-I, -II et -III, observée à la fois chez le rat et l'humain, suggère néanmoins l'importance d'une telle promiscuité. En effet, des interactions protéine-protéine entre les facteurs ont toutes les chances d'être impliquées dans le mécanisme de contrôle.

Une analyse informatisée par matrices d'homologie n'a révélé aucune similarité de séquences significative entre la région promotrice PK-L humaine identifiée et la portion 5' flanquante du gène de la pyruvate kinase humaine de type M proposée par Takenaka et al (1991). Le gène PK-M code pour les isoenzymes  $M_1$  et  $M_2$ . Le type  $M_1$  est la seule forme détectée dans les tissus foetaux primitifs et on le rencontre dans la plupart des tissus adultes; l'isoenzyme  $M_2$  est spécifique aux muscles squelettiques, au coeur et au cerveau (Takenaka et al, 1991). Ainsi, l'absence d'homologie des régions promotrices PK-L et PK-M apporte un argument supplémentaire quant à l'implication des éléments PKL-I, -II et -III au niveau de la régulation de la spécificité hépatique de l'expression de l'isoenzyme PK-L.

Même si quatre types PK différents sont distingués dans des tissus spécifiques

des vertébrés, une seule forme est généralement rencontrée chez les procaryotes et les eucaryotes inférieurs (Allert et al, 1991). L'analyse des séquences des gènes PK de *Trypanosoma brucei*, *Aspergillus nidulans* et *Saccharomyces cerevisiae* n'a permis l'observation d'aucune homologie notoire avec les sites régulateurs du promoteur PK-L humain, suggérant à nouveau l'importance des régions PKL-I, -II et -III dans la spécificité tissulaire de l'expression du type PK-L humain.

La séquence promotrice PK-L humaine a été comparée aux séquences des promoteurs d'autres gènes à spécificité hépatique. Des régions homologues aux éléments PKL-I, -II et -III ont été identifiées (tableau 12). La boîte PKL-I est homologue à la séquence rapportée pour le site de liaison du facteur LF-B1 du promoteur des gènes  $\alpha$ - et  $\beta$ -fibrinogène (Courtois et al, 1987), albumine (Schorpp et al, 1988; Maire et al, 1989),  $\alpha$ 1-antitrypsine (Hardon et al, 1988) et  $\alpha$ -fétoprotéine (Jose-Estanyol et Danan, 1988). La séquence PKL-II évoque celle du site de liaison du LF-A1 décrit pour la première fois aux positions -119 à -107 en amont du gène  $\alpha$ 1-antitrypsine (De Simone et al, 1987). Ces auteurs ont également montré la liaison du même facteur aux régions promotrices de nombreux autres gènes spécifiques au foie, par exemple les gènes pour l'haptoglobine et l'apolipoprotéine A1 humaines. Enfin, l'élément PKL-III lie, chez le rat, une protéine ubiquitaire. A la séquence hexamérique CCCGTG en position -82 du promoteur  $\gamma$ -fibrinogène, a été attribuée la capacité de lier le facteur ubiquitaire MLTV, initialement identifié comme un activateur puissant de la transcription majeure tardive chez l'adénovirus (Sawadogo et Roeder, 1985; Carthew et al, 1985; Chodosh et al, 1987). La même séquence

**TABLEAU 12. ALIGNEMENT DE SEQUENCES HOMOLOGUES AUX ELEMENTS REGULATEURS PKL-I, -II ET -III DU PROMOTEUR L HUMAIN**

Site régulateur	Séquence	Gène
PKL-I/L1 (LFB-I)	-125 GTGGTGACACTTTAACCAG -107 -110 CTGGTTATACTTTAACCAG -76 -62 GTGGTTAATGATCTA-CAG -40 -64 AAGGTTACTAGTTAA-CAG -42 -77 TTGGTTAATATTCA-CCAG -55 -82 TTAGTTAATATTTGA-CAG -98 -45 TAGGTTAATCATCA-CCCT -61	PK-L (humain) PK-L (rat) Albumine (rat) $\alpha$ -fétoprotéine (rat) $\alpha_1$ -antitrypsine (humain) $\beta$ -fibrinogène (rat) $\alpha$ -fibrinogène (rat)
PKL-II/L3 (LF-A1)	-173 TGGACTCTGGCCC -160 -161 TGGACTCTGGCCC -149 -119 TGGACTTAGCCCC -107 -80 TAGACACAGGAAT -68 -214 TGAACCCTTGACC -202	PK-L (humain) PK-L (rat) $\alpha_1$ -antitrypsine (humain) Haptoglobine (humain) Apolipoprotéine A1 (humain)
PKL-III/L4 (MLTF)	-196 CCACGGGGCACTCCCGTGG -178 -184 CCACGGGGCACTCCCGTGG -150 -81 CCCGTG -76	PK-L (humain) PK-L (rat) $\gamma$ -fibrinogène (rat)

*Les séquences des sites régulateurs reconnues par le facteur de transcription approprié sont alignées avec des séquences homologues variées. Des espaces (-) assurent un alignement optimal. Seuls les brins codants sont montrés. Les points de contact protéine-ADN identifiés chez le rat sont soulignés.*

hexamérique est présente au site PKL-III du gène de la pyruvate kinase de type L humaine et de rat, suggérant la liaison possible de la même protéine en amont du gène PK-L.

Des expériences d'interférence de la méthylation, utilisant des oligonucléotides de synthèse identiques aux séquences PKL-I, -II et-III du promoteur PK-L du rat, ont permis à Vaultont et al (1989) d'identifier des points de contacts des éléments régulateurs avec leur facteur transcriptionnel respectif. Tel qu'indiqué au tableau 12, les points de contact ADN-protéine sont hautement conservés parmi les différents promoteurs des gènes de spécificité hépatique relevés chez l'humain et le rat, dont celui du gène PK-L humain.

Les régions du promoteur PK-L du rat impliquées dans le contrôle du gène par la diète (hydrates de carbone) et les hormones ont été investiguées par détermination du niveau d'expression d'hépatocytes primaires transfectés avec des vecteurs plasmidiques contenant la région 5' flanquante du gène PK-L du rat fusionnée au gène CAT (Thompson et Towle, 1991). Les auteurs ont localisé un site de réponse aux hydrates de carbone ("carbohydrate response element") à la région comprise entre les bases -112 et -213 du gène PK-L du rat. Une séquence correspondante du promoteur PK-L humain (nucléotides -126 à -219) y est homologue à plus de 80%, laissant supposer son implication au niveau de la régulation de l'expression du gène par les hydrates de carbone. La région inclut les sites de liaison des facteurs de spécificité hépatique LF-A1 (PKL-II) et des protéines ubiquitaires NF1 (L2) et MLTF (PKL-III). De façon surprenante, ces facteurs sont reconnus pour se lier à des

éléments régulateurs de gènes dont l'expression n'est pas stimulée par les glucides de la diète. De plus, Vaultont et al (1989) n'ont rapporté, pour cette région, aucune différence dans les patrons de "footprinting" en utilisant des extraits nucléaires isolés de rats à jeûns ou soumis à une diète riche en hydrates de carbone. A cet égard, Yamada et al (1990) ont récemment suggéré la liaison, à cette région, de facteurs nucléaires différents des protéines LFA1 et MLTF. Alternativement, la réponse aux glucides pourrait être médiée par l'un des facteurs connus (LF-A1, NF1 ou MLTF) d'une façon encore non décrite, peut-être par l'interaction d'une protéine, ne se liant pas à l'ADN, avec l'un de ces facteurs.

## **2. Identification de marqueurs génétiques associés à l'anémie hémolytique**

### **2.1 Identification et caractérisation des gènes *hmf1* et *hmf2***

La génération de produits PCR non spécifiques est un phénomène usuel et généralement sans intérêt. Pourtant, en corrigeant les conditions expérimentales d'amplification PCR (§ 1 du chapitre "Résultats") de façon à défavoriser les hybridations non spécifiques artéfactuelles, la présence de facteurs intrinsèques peut dès lors justifier la production des séquences inattendues. Certains auteurs ont exploité la présence de fragments PCR non spécifiques comme méthode de "fingerprinting" (Welsh et McClelland, 1990) et comme outil pour la détection de polymorphismes (Williams et al, 1990).

Dans des conditions optimales, la détection d'une seule bande est pronostiquée

après électrophorèse des produits PCR d'un gène nucléaire à copie unique par génome haploïde. Tel que représenté à la figure 20, l'amplification de chaque exon du gène PK-L produit généralement une bande orpheline sur gel d'agarose. Seule la réaction PCR impliquant l'exon 6 génère systématiquement des séquences supplémentaires d'intensité égale ou supérieure au fragment d'intérêt (270pb). Ces produits compétiteurs n'apparaissent cependant qu'avec les patients hémolytiques (A.C., Ma.G., ME.Du. et G.G.); on ne les observe ni chez les individus normaux, ni chez les hétérozygotes porteurs de la déficience en pyruvate kinase.

Même si l'apparition des deux séquences additionnelles semble reliée à la condition hémolytique des patients impliqués, elle apparaît toutefois indépendante du déficit en pyruvate kinase érythrocytaire. En effet, tel qu'indiqué au tableau 5, le patient G.G. présente une activité PK-R normale en dépit d'une pathologie hémolytique notable; pourtant, les produits d'amplification PCR de l'exon 6, chez ce patient, incluent les mêmes bandes supplémentaires observées chez les individus anémiques par déficience en PK-R (figure 26).

Nous avons considéré la possibilité de retrouver les fragments compétiteurs à proximité de l'exon 6 du gène PK-L; la séquence de l'intron 5 adjacente à celle de l'oligonucléotide PKLS6, n'a cependant révélé aucune homologie avec les marqueurs génétiques *hmf1* et *hmf2*. Il était également envisageable qu'une infection opportuniste soit associée à l'état hémolytique des patients, les séquences supplémentaires *hmf1* et *hmf2* dérivant ainsi des agents infectieux. Toutefois, en éliminant l'amorce PKLA6 des mélanges réactionnels, les bandes additionnelles devenaient également

décelables chez les individus normaux, infirmant l'hypothèse envisagée.

La spécificité de l'amplification des produits supplémentaires chez les patients anémiques devait s'expliquer autrement. Des analyses génétiques ont révélé, dans le génome de certains patients, la présence de copies multiples du marqueur *hmf2*. L'apparition spécifique du fragment supplémentaire *hmf1*, chez les individus anémiques semble plutôt la conséquence d'un réarrangement génomique, tel que détecté par buvardage de type "Southern".

Des études d'homologie de séquences confrontant *hmf1*, *hmf2* et la banque de données "GenBank", ont permis d'identifier une similarité nucléotidique d'environ 50%, respectivement avec la région 3' non codante du gène du récepteur du facteur de croissance humain dérivé des plaquettes (PDGFr), et avec la région 5' codante du gène de l'interféron- $\alpha$ A de boeuf (BOVIFN- $\alpha$ A). Considérant l'abondance des informations incluses dans "GenBank" (85 000 nucléotides dans 67 000 entrées provenant de 3000 organismes différents, Burks et al, 1992), de telles similarités apparaissent relativement faibles; aussi, devons-nous envisager la possibilité qu'une homologie de 50% soit non significative. Néanmoins, l'hybridation des séquences *hmf1* et *hmf2* à des fragments génomiques uniques, offre un motif important d'investigation. Ainsi, nous proposons l'existence de gènes similaires aux gènes PDGFr et BOVIFN- $\alpha$ A, auxquels appartiendraient les fragments PCR supplémentaires *hmf1* et *hmf2*, respectivement.

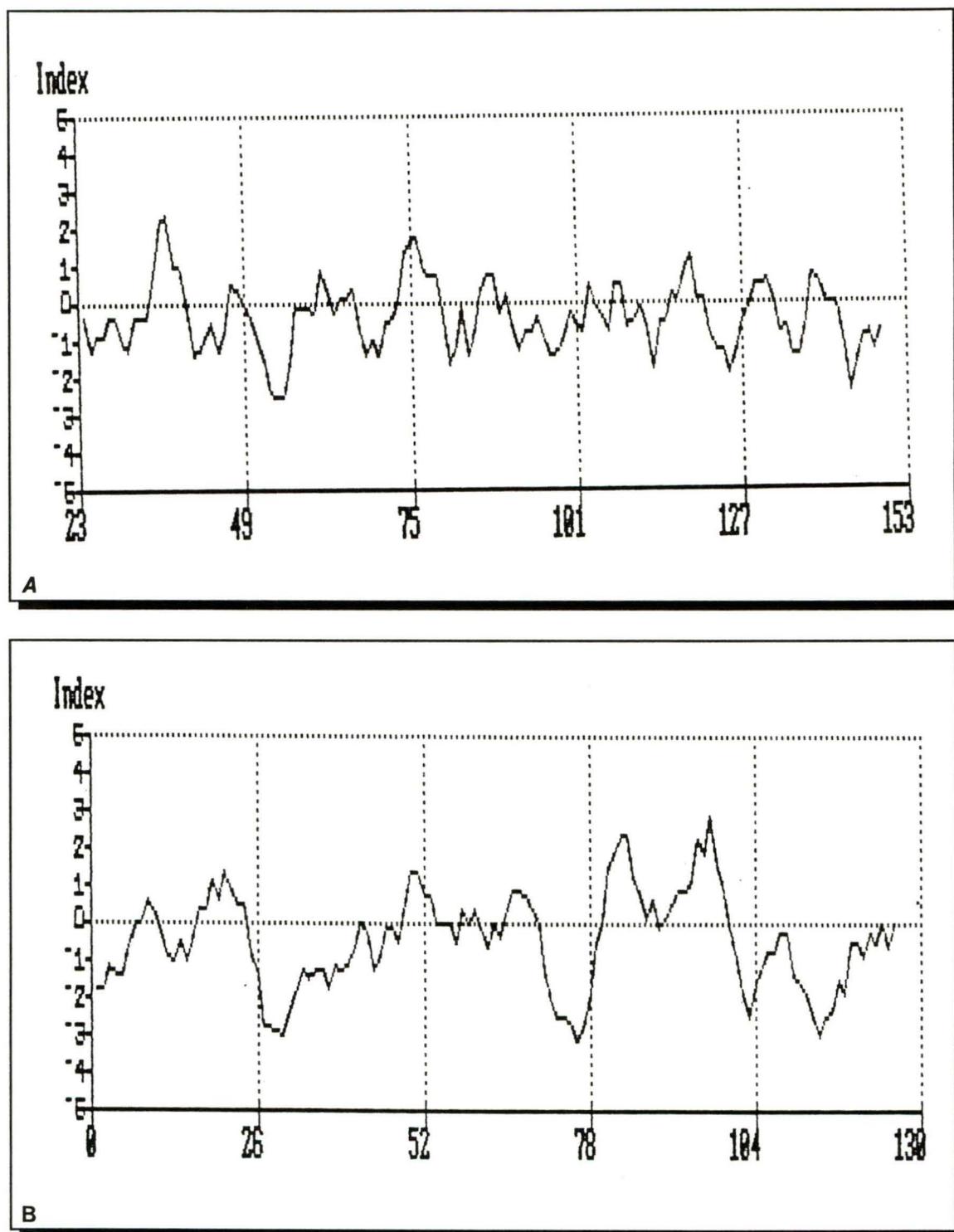
Un cadre de lecture ouvert ne s'observe qu'avec le fragment *hmf2*. La séquence en acides aminés ne présente aucune homologie significative avec celle des

interférons- $\alpha$  d'origine humaine ou de mammifères (Velan et al, 1985). L'analyse par "Northern blots" suggère l'expression du marqueur *hmf2*; elle demeure négative pour *hmf1*. De plus, l'ARNm du gène BOVIFN- $\alpha$ A présente une taille inférieure (1,2Kb) (Tovey et al, 1987) à celle détectée pour *hmf2* (3,2Kb).

Des similarités sont constatées en comparant les profils d'hydrophobicité des acides aminés correspondants des protéines *hmf2* et BOVIFN- $\alpha$ A (figure 39). Kite et Doolittle (1982) ont examiné le caractère hydrophatique de plusieurs protéines de structures tridimensionnelles connues. Une excellente corrélation a été mise en évidence entre les portions protéiques intérieures observées et les régions hydrophobes calculées, de même qu'entre les portions protéiques externes observées et les régions hydrophiles calculées. Des segments hydrophobes nécessaires à l'ancrage des protéines aux membranes cellulaires ont également été identifiés. Ainsi, la visualisation graphique du caractère hydrophatique d'une protéine permet de prédire certains de ses aspects tridimensionnels. Par extension, l'homologie des tendances hydrophiles et hydrophobes des chaînes peptidiques *hmf2* et BOVIFN- $\alpha$ A suggère la similarité structurelle des deux protéines.

## **2.2 Rôles physiologiques des gènes *hmf 1* et *hmf2***

La nature déduite des gènes *hmf1* et *hmf2* combinée aux évidences de leur réarrangement spécifique chez les patients hémolytiques, laissent présumer une implication physiologique des deux marqueurs génétiques étudiés. Plusieurs coïncidences suggèrent la corrélation des réarrangements *hmf1* et *hmf2* avec les



**FIGURE 39.** Profils d'hydrophobicité du facteur interféron A- $\alpha$  de boeuf (A) et du marqueur génétique hmf2 humain (B). Le logiciel "Prosis" a servi aux calculs des tracés en utilisant une fenêtre de 6 acides aminés et un indice moyen de -0,41 (A) ou -0,54 (B).

mécanismes de l'érythropoïèse et de l'oncogénèse.

### **2.2.1 Implication au niveau des mécanismes érythropoïétiques**

L'anémie hémolytique survient lors d'une hyperdestruction érythrocytaire, conséquence d'une stabilité réduite des hématies. L'hémolyse accrue s'accompagne d'une augmentation simultanée de l'érythropoïèse. Les phénomènes de réticulocytose et de bilirubinémie élevées témoignent d'une stimulation du cycle production-destruction des globules rouges. La relation entre l'anémie hémolytique et l'érythropoïèse est peu documentée, mais supportée par deux observations fondamentales. D'abord, le mécanisme compensatoire par stimulation érythropoïétique a été évalué par mesure de la synthèse d'hémoglobine et de l'excrétion de bilirubine. En cas de stimulation maximale, la moelle osseuse peut augmenter sa production d'érythrocytes par un facteur de 6 à 8 fois. Lorsqu'une telle compensation médullaire optimale existe, la durée de vie des hématies qui circulent peut théoriquement passer de 120 jours à 15 à 20 jours sans qu'une anémie n'apparaisse, on parle alors d'une maladie hémolytique compensée. Aussi, le terme "d'anémie hémolytique" s'applique-t-il plutôt aux circonstances dans lesquelles le temps de survie des érythrocytes est si court qu'une anémie apparaît malgré l'érythropoïèse intense (Crosby et Akeroyd, 1952). La seconde observation relève de la présence d'une corrélation inverse entre le compte de réticulocytes et l'hématocrite des patients hémolytiques déficients en pyruvate kinase. Plus l'anémie est profonde (faible hématocrite), plus le taux de réticulocytes est élevé, témoignant d'une stimulation de l'érythropoïèse par l'anémie (de Médicis, 1991).

Les facteurs de croissance hématopoïétique ou CSF (pour "colony stimulating factor") représentent un groupe d'hormones glycoprotéiques capables de contrôler le fonctionnement de l'hématopoïèse en agissant sur le couple prolifération-différenciation des cellules souches médullaires pluripotentes jusqu'aux stades les plus matures des cellules sanguines. Les CSF sont des cytokines moléculairement identifiées ou en cours d'individualisation, dont l'action passe par leur fixation à des récepteurs membranaires spécifiques. Cette liaison des cytokines fait intervenir des mécanismes de transduction de signaux aboutissant à une cascade d'effets biologiques.

Les globules rouges matures sont générés via la prolifération et la différenciation de cellules souches en plusieurs populations cellulaires connexes. Les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance à des progéniteurs érythroïdes spécifiques désignés CFU-GEMM ("colony forming unit-granulocytes, érythrocytes, macrophages, mégakaryocytes"), BFU-E ("burst forming units-erythroid") et CFU-E ("colony forming units-erythroid") (Till et McCulloch, 1980). Ultérieurement, des précurseurs érythrocytaires (érythroblastes et réticulocytes) dérivent de ces progéniteurs (Goldwasser, 1975). Cette hiérarchie cellulaire répond à une hiérarchie parallèle de facteurs de croissance capables de lier des patrons de récepteurs spécifiques à chaque type cellulaire (tableau 13). La plupart des cytokines sont communes aux différentes lignées cellulaires (érythroïde, myéloïde et lymphoïde); l'érythropoïétine constitue la seule hormone identifiée capable d'agir uniquement sur les cellules érythroïdes (Krantz, 1991). Certains facteurs de transcription sont aussi spécifiques aux cellules de la lignée érythroïde (tableau13).

**TABEAU 13. RESUME DES FACTEURS TRANSCRIPTIONNELS, CYTOKINES ET RECEPTEURS CONTROLANT L'ERYTHROPOIESE\***

Cellules	Facteurs de transcription	Cytokines	Récepteurs des cytokines
<u>Cellules souches pluripotentes</u>	c-myb (2) SCL (3) TCL5, tal-1	IL-1 (4) SCF (5) CSF-1 (6) -	IL-1r c-kit (5) c-fms (6) flk-2 (6)
<u>Progéniteurs</u>			
CFU-GEMM		IL-1 (4)(7) SCF (5) CSF-1 (6) - IL3 (1)(8)(9) GM-CSF (1)(8)(9) TGF $\beta$ (7)	IL-IR c-kit c-fms flk-2 (6) IL-3r (10) GM-CSFr -
BFU-E		SCF (5) CSF-1 (6) IL-3 (1)(9) GM-CSF (1)(9) EPO (8)(9) bFGF (1) TGF $\alpha$ (13)	c-kit c-fms IL-3r (10) GM-CSFr (10) EPOr (10)(11) bek (12) EGFr (c-erbB)(13)
CFU-E	GATA-1,2,3 NFE-2	IL-3 GM-CSF EPO (9) bFGF (1)	IL-3r (10) GM-CSFr (10) EPOr (10)(11) bek

\* La liste a été construite à partir de données s'appliquant exclusivement aux lignées érythroïdes d'origine humaine ou animale.

1- Gabbianelli et al, 1990  
2- Mucenski et al, 1991  
3- Aplan et al, 1990  
4- Wendling et Tambourin, 1991

5- Witte, 1990  
6- Matthews et al, 1991  
7- Dubois et al, 1990  
8- Clark et Kamen, 1987  
9- Emerson, 1990

10- Nicola et Metcalf, 1991  
11- D'Andrea et Zon, 1990  
12- Ullrich et Schlessinger, 1990  
13- Pain et al, 1991

Nous pensons qu'il existe d'autres cytokines et d'autres récepteurs spécifiques qui permettent d'expliquer le contrôle de l'érythropoïèse. Certaines évidences nous permettent d'avancer l'hypothèse d'une implication des marqueurs *hmf1* et *hmf2* dans le système responsable de l'érythropoïèse.

La nature déduite des gènes *hmf1* et *hmf2* suggère leur appartenance à un système de transduction de signal. La séquence apparaît similaire au prototype des récepteurs tyrosine kinase, le PDGFR, même si elle se localise dans une région du gène peu conservée entre les différents membres de la même classe de récepteurs, tels EPOr, c-fms et c-kit (Ullrich et Schlessinger, 1990). *Hmf2* est relié à l'interféron- $\alpha$ , un facteur pourvu de propriétés antivirales, antiprolifératives et immunorégulatrices, et principalement reconnu pour son activité anti-tumorale vis-à-vis de néoplasies hématologiques (Appelbaum, 1990). Le mécanisme d'action de l'interféron- $\alpha$  sur les cellules sanguines demeure inconnu. Cependant, les interférons de type I semblent agir comme les cytokines. Ils favorisent la différenciation des cellules souches en lignée érythroïde, plutôt qu'en lignées lymphoïde ou myéloïde, dans la leucémie à "hairy cells" (Michalevicz et Revel, 1987).

Nos résultats laissent également supposer la présence du réarrangement des gènes *hmf1* et *hmf2*. Ces réarrangements ont été identifiés dans le cadre de l'étude portant sur l'anémie hémolytique, un modèle de régulation positive où prend place un accroissement sélectif de l'érythropoïèse. Cette observation suggère l'implication des gènes correspondants au niveau de l'érythropoïèse, dans un but compensatoire de l'anémie hémolytique chez les patients étudiés.

### **2.2.2 Implication au niveau des mécanismes de carcinogénèse**

Le cancer est un dysfonctionnement qui affecte le "comportement social" des cellules au sein d'un tissu. En 1958, Foulds mettait en évidence un principe majeur dans l'étude des mécanismes carcinogéniques, selon lequel le processus cancéreux évolue progressivement en franchissant de multiples étapes distinctes. Dans plusieurs systèmes, au moins 3 phases qualitativement discernables ont été définies: l'initiation, le développement et la progression (Weinstein, 1988). Différentes théories ont été proposées quant à la nature des événements précoces responsables de l'initiation de la carcinogénèse: la transfection d'oncogènes viraux, la mutagénèse insertionnelle, les translocations chromosomiques, les réarrangements d'ADN et l'amplification de gènes (Bishop, 1987). Certains auteurs favorisent une conception selon laquelle les lésions génétiques affectant le génome d'une cellule qui devient cancéreuse ont pour effet de perturber profondément l'émission, la reconnaissance ou la réponse à divers signaux qui régularisent la prolifération, la différenciation et la durée de vie des cellules. A ce titre, les facteurs de croissance, leurs récepteurs et les messageries intracellulaires qu'ils déclenchent contribuent de façon déterminante au processus de transformation et de progression néoplasique (Cross et Dexter, 1991; Pommier, 1992).

La leucémie se caractérise par la prolifération ou l'expansion incontrôlée des cellules hématopoïétiques qui perdent leur capacité à se différencier normalement en cellules sanguines matures. Plusieurs gènes érythroïdes ont été impliqués dans le processus leucémique (Sawyers et al, 1991). Deux rétrovirus sont responsables de l'érythroleucémie: le AEV possédant le gène v-erbB, et le SFFV, qui produit la

recombinaison génomique du gène EPOr. L'érythroleucémie résulte également de la recombinaison c-fms. La modification d'autres gènes érythroïdes ou myéloïdes, tels IL-3 et GM-CSF, évolue en leucémies, affectant les lignées de cellules souches. L'absence de différenciation des cellules souches provoque des syndromes myélodysplastiques, souvent considérés comme la première étape du processus leucémique.

Trois cas de leucémies myélomonocytiques ont été rapportés chez des patients atteints d'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire par déficience en pyruvate kinase (Vives-Corrons et al, 1979; Ohta et al, 1984; Ieki et al, 1990). Les deux affections sont peu fréquentes, avec des prévalences d'environ 1:100 000 (Valentine et al, 1989; Auclerc et Khayat, 1990). Ainsi, la probabilité de survenue indépendante des deux maladies chez le même patient est infime. La déficience en pyruvate kinase pourrait donc constituer un facteur de risque en oncogénèse. Nous pensons qu'un tel rôle puisse être assumé par le réarrangement des gènes *hmf1* et *hmf2* exclusivement observé chez les patients anémiques. En effet, ce réarrangement génomique, impliquant des protéines génétiquement homologues à des facteurs de croissance cellulaire et leurs récepteurs (BOVIFN- $\alpha$ A et PDGFr), pourrait servir d'événement initiateur du processus leucémique.

Le lien entre la déficience génétique en pyruvate kinase érythrocytaire et l'évolution oncogénique n'a jamais été démontré. Pourtant, le gène PK-L est localisé à la bande q21 du chromosome 1 (Satoh et al, 1988), une position fréquemment impliquée dans les translocations leucémiques (Mitelman, 1986). De plus, une amplification *in vivo* du gène PK-L a été détectée chez un patient présentant un

syndrome myélodysplastique avec translocation t(1;7) (Tani et al, 1989).

Trois sites possibles de réarrangements d'ADN sont également localisés en position 1q21-23: un site fragile d'intégration de l'adénovirus-12 et le gène d'une protéine à homéodomains impliqué dans une translocation t(19;1) identifiée chez un malade atteint de leucémie pré-B. L'implication spécifique du locus PK-L avec les réarrangements *hmf1* et *hmf2* reste à déterminer.

# CONCLUSION

---

Ces travaux placent l'accent sur les bases moléculaires de l'anémie hémolytique congénitale par déficience en pyruvate kinase érythrocytaire. Progressant au rythme de l'optimisation de certaines conditions expérimentales, cette caractérisation moléculaire devait également aboutir à l'identification de nouvelles séquences du gène PK-L, et notamment celles du promoteur PK-L et de certains introns.

Confrontée aux erreurs introduites par la polymérase Taq, à celles susceptibles d'être présentes dans les séquences originales publiées, de même qu'à l'existence de polymorphismes naturels issus de l'évolution des populations humaines, la recherche d'une lésion génomique structurale chez un sujet Québécois (A.C.) s'est avérée infructueuse. L'étude devait néanmoins aboutir à l'identification systématique de 3 variants non pathologiques de même qu'à la mise en évidence d'une mutation silencieuse chez un individu d'origine orientale. La convergence des analyses génétiques, cinétiques et immunologiques devait également permettre l'élaboration d'une nouvelle hypothèse, celle d'une mutation de régulation. Fortement plausible, cette proposition demeure néanmoins contestable de par la probabilité d'une divergence génétique au niveau des consensus introniques non séquencés ou des sites d'hybridation des amorces non testées, et sa démonstration sous-tend l'identification préalable des séquences promotrices spécifiques à l'isoenzyme érythrocytaire (PK-R).

Même si plusieurs maladies génétiques résultent d'un extraordinaire éventail de mutations, le déficit en PK-R semble plutôt associé à un nombre restreint d'allèles

déficients. De même, la nature de la mutation pourrait jouer un rôle dans la sévérité de la pathologie, tel que suggéré par les mutants à phénotype sévère PK-Linz et PK-Québec, respectivement atteints en leur site actif et régulateur. Parallèlement, la morphologie cellulaire des érythrocytes affligés constitue peut-être un indice de la sévérité pathologique et, par extension, du type de lésion génomique impliqué.

La définition récente de mutations structurales PK laisse entrevoir des perspectives certaines. La reconnaissance des mêmes lésions génétiques japonaises, turques ou libanaises dans certaines familles Québécoises contribuerait à retracer, par bribes, l'histoire évolutive des populations concernées. De même, la validation d'un test d'identification des hétérozygotes basé sur l'hybridation d'oligonucléotides spécifiques de l'allèle muté (ASO), pourrait concourir au dépistage prénatal des anomalies du gène PK-L. Des avancées majeures se dégageraient également de l'évaluation, par dynamique moléculaire, des conséquences de telles mutations sur la structure tridimensionnelle de l'enzyme, contribuant à cerner des relations structure-fonction.

Le "background" génétique entourant une mutation a peut-être une implication importante dans les mécanismes compensatoires de l'hémolyse, tel qu'observé par le réarrangement, non transmissible héréditairement, des marqueurs génétiques *hmf1* et *hmf2* associés à l'anémie hémolytique congénitale. La nature même des gènes *hmf1* et *hmf2* déduite de leur homologie de séquence respective avec le récepteur du facteur de croissance humain PDGF et l'interféron- $\alpha$ A de boeuf, suggère leur participation au mécanisme de l'érythropoïèse, dans un but compensatoire de

l'anémie hémolytique. Plusieurs proto-oncogènes figurent dans la voie cytokine-dépendante de prolifération et de différenciation des lignées hématopoïétiques. Dans les séries érythroïdes, l'érythropoïétine est l'unique cytokine identifiée pour agir exclusivement sur les cellules progénitrices érythroïdes. Le facteur de croissance est administré aux malades principalement afin de pallier aux carences entraînées par l'hémodialyse. Cependant, certains patients répondent mal à l'érythropoïétine, et notamment les sujets atteints d'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire due à une déficience en pyruvate kinase (Zachée et al, 1989). De par une spécificité différente et/ou complémentaire à l'érythropoïétine, le facteur *hmf2*, putativement impliqué dans la différenciation de la lignée érythroïde, pourrait éventuellement participer au traitement de nombreuses maladies hématologiques.

La participation des réarrangements *hmf1* et *hmf2* aux mécanismes de carcinogénèse est également suspectée. La démonstration définitive d'une telle hypothèse suppose une méthodologie complexe. Les ADNc des marqueurs génétiques *hmf1* et *hmf2* devront d'abord être clonés, et leur patron d'expression étudié dans les séries érythroïdes et myéloïdes. L'enjeu implique également la localisation chromosomique des facteurs *hmf1* et *hmf2* et leur cartographie à l'aide de clones de chromosomes artificiels de levure. Il serait dès lors possible d'investiguer les cas de réarrangements chez les patients avec anémie hémolytique, leucémie ou autres conditions de cancer du sang.

Même si une homologie des profils d'hydrophobicité des protéines *hmf2* et BOVIFN- $\alpha$ A a été soulevée, et une démonstration précaire de l'expression du

marqueur *hmf2* présentée, la cohérence des séquences *hmf1* et *hmf2* reste encore largement à décrypter, et particulièrement dans la perspective de la définition d'éventuelles stratégies thérapeutiques.

Globalement, cette étude ajoute aux connaissances moléculaires du gène de la pyruvate kinase de type L, de même qu'à la compréhension génétique de la déficience PK-R et de sa pathologie associée, l'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire. Nombreuses sont les lignes de recherche qui se dessinent désormais sur les acquis de ces travaux fondamentaux et étiologiques.

# REMERCIEMENTS

---

Lorsque conduite dans un esprit de confiance, la recherche devient une discipline gratifiante. A cet égard, mes remerciements s'adressent sincèrement à Dr Eveline de Médicis. En m'assurant la participation à de nombreux colloques, conférences ou congrès, sources même de l'information scientifique, elle a su m'enticher de cette griserie intellectuelle indispensable à la compréhension du monde biologique.

Il m'est également agréable d'exprimer ma gratitude à tous les professeurs du Département de Biochimie et aux membres du jury de ce mémoire pour leur participation à mon cheminement académique, pour le partage d'idées et les critiques constructives.

Un merci particulier aux docteurs David Gibson, Gilles Dupuis et Rinaldo de Médicis, respectivement pour l'accès à la banque de données GenBank, pour la disponibilité du logiciel "Prosis" et pour le temps consacré à la réalisation des photomicrographies électroniques à balayage.

Je tiens aussi à remercier vivement mes compagnons de travail pour cet esprit de collaboration, pour tous ces sourires et ces éclats de rire.

Ma reconnaissance s'adresse également à l'aide financière du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG).

Enfin, il me faut souligner combien j'apprécie la compréhension et l'éternel soutien de mes parents qui m'ont permis de faire ce que j'aimais...

# REFERENCES

---

- Allert S., Ernest I., Poliszczak A., Opperdoes FR. & Michels PAM. (1991). Molecular cloning and analysis of two tandemly linked genes for pyruvate kinase of *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* **200**: 19-27.
- Aplan PD., Lombardi DP, Ginsberg AM., Cossman J., Bertness VL. & Kirsch IR.(1990). Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity. *Science* **250**: 1426-1429.
- Appelbaum FR. (1990). Introduction and overview of interferon  $\alpha$  in myeloproliferative and hemangiomatous diseases. *Sem. Hematol.* **27 (suppl. 4)**: 1-15.
- Auclerc G. & Khayat D. (1990). *Révision accélérée en hématologie*, 2<sup>e</sup> éd., Maloine, Paris, p.29-36.
- Ausubel FM., Brent R., Kingston RE., Moore DD., Seidman JG., Smith JA. & Struhl K. (1989). *Current Protocols in Molecular Biology* (volume 1), Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, p.3.16.8.
- Bessis M. (1972). Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **12**: 721.
- Bishop MJ (1987). The molecular genetics of cancer. *Science* **235**: 305-311.
- Boivin P. (1971). Déficit en pyruvate kinase. Dans Gajdos A. (Ed.): *Les enzymopathies* (tome 1), Masson, Paris, p.190.
- Boivin P., Galand C. & Demartial MC. (1972). Etude sur la pyruvate kinase érythrocytaire. II. Hétérogénéité enzymologique des déficits. Etude à propos de 28 cas avec anémie hémolytique congénitale. *Nouv. Rev. Fr. Hematol. Blood Cells* **12**: 569-594.
- Bossu M., Dacha M. & Fornaini G. (1968). Neonatal hemolysis due to a transient severity of inherited pyruvate kinase deficiency. *Acta Haemat.* **40**: 166-175.
- Bowmann HS. & al (1965). Pyruvate kinase deficient hemolytic anemia in an Amish isolate. *Am. J. Hum. Genet.* **17**: 1.
- Brecher G. & Bessis M. (1972). Present status of spiculated red cells and their relationship to the discocyte-echinocyte transformation: a critical review. *Blood* **40 (3)**: 333-344.

Bullock WO, Fernandez JM. & Short JM. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escheria coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5** (4): 376-379.

Burks C., Cinkosky MJ., Fischer WM., Gilna P., Hayden JED., Keen GM., Kelly M., Kristofferson D. & Lawrence J. (1992). GenBank. *Nucleic Acids Res.* **20** supplement: 2065-2069.

Carson PE., Flanagan CL., Ickes CE. & Alving AS. (1956). Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* **124**: 484-485.

Carthew RW., Chodosh L. & Sharp P. (1985). An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter. *Cell* **43**: 439-448.

Chan Y-L., Olvera J. & Wool IG. (1983). The structure of rat 28S ribosomal ribonucleic acid inferred from the sequence of nucleotides in a gene. *Nucleic Acids Res.* **11** (22): 7819-7831.

Chan YL., Gutell R., Nollers HF. & Wool IG. (1984). The nucleotide sequence of a rat 18S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **259** (1): 224-230.

Chelly K., Kaplan JC., Maire P., Gautron S. & Kahn A. (1988). Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* **333**: 858-860.

Chelly J., Concordet J-P., Kaplan J-C. & Kahn A. (1989). Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2617-2621.

Chelly J., Montarras D., Pinset C, Berwald-Netter Y., Kaplan J-C. & Kahn A. (1990). Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *Eur. J. Biochem.* **187**: 691-698.

Chodosh L., Carthew RW., Morgan J., Crabtree G. & Sharp P. (1987). The adenovirus major late transcription factor activates the rat gamma-fibrinogen promoter. *Science* **238**: 684-688.

Chomczynski P. & Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159.

- Claesson-Welsh L., Erikson A., Morin A., Severinsson L., Ek B., Ostoman A., Betsholtz C. & Heldin CH. (1988). cDNA cloning and expression of a human platelet-derived growth factor (PDGF) receptor specific for  $\beta$ -chain-containing PDGF molecules. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3476-3486.
- Clark SC. & Kamen R. (1987). The human hematopoietic colony - stimulating factors *Science* **236**: 1229.
- Cognet M., Rone YC., Vaulont S., Kahn A. & Marie J. (1987). Structure of the rat L-type pyruvate kinase gene. *J. Mol. Biol.* **196**: 11-25.
- Cognet M., Bergot M-O. & Kahn A. (1991). Cis-acting DNA elements regulating expression of the liver pyruvate kinase gene in hepatoocytes and hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **266** (12): 7368-7375.
- Courtois G., Morgan JG., Campbell LA., Fourel G. & Crabtree GR. (1987). Interaction of a liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha 1-antitrypsin promoters. *Science* **238**: 688-692.
- Cox R.A. (1968). The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* **12**, 120-129.
- Crosby WH. & Akeroyd JH. (1952). The limit of hemoglobin synthesis in hereditary hemolytic anemia. *Am. J. Med.* **13**: 273.
- Cross M. & Dexter M. (1991). Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* **64**: 271-280.
- D'Andrea AD. & Zon L.I. (1990). Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J. Clin Invest.* **86**: 681-687.
- Dacie JV., Mollison PL., Richardson N., Selwyn JG. & Shapiro L. (1953). Atypical congenital haemolytic anaemia. *Q. J. Med.* **22**: 79-98.
- de Médicis E. (1991). L'anémie hémolytique héréditaire due à la pyruvate kinase. *Chimiste* **6** (5): 18-20.
- de Médicis E., Ross P., Friedmen R., Hume H., Marceau D., Milot M., Lyonnais J. & De Braekeleer M. (1992). Hereditary non spherocytic hemolytic anemia due to pyruvate kinase deficiency: a prevalence study in Quebec (Canada). *Hum. Hered.* **42**: 179-183.

- De Gruchy GC., Crawford H. & Morton D. (1958). A typical (non-spherocytic) congenital haemolytic anaemia. *Proc. VII Congr. Int. Soc. Hematol.*, Rome, II, Pensiero Scientifico, vol. 2, pt1, p.425.
- De Gruchy GC., Santamaria JN., Parsons IC. & Crawford H. (1960). Non-spherocytic congenital hemolytic anemia. *Blood* **16**: 1371-1397.
- De Simone V., Ciliberto G., Hardon E., Paonessa G., Palla, F., Lundberg L. & Cortese R. (1987). Cis- and trans-acting elements responsible for the cell-specific expression of the human alpha 1-antitrypsin gene. *EMBO J.* **6**: 2759-2766.
- Deiss A. & Kurth D. (1970). Circulating reticulocytes in normal adults as determined by the new methylene blue method. *Am. J. Clin. Pathol.* **53**: 481-484.
- Delaunay J. & Dhermy D. (1990). Le squelette érythrocytaire et les maladies génétiques de la forme du globule rouge. *Med. Sci.* **6**: 652-670.
- Dubois CM., Ruscetti FW., Palaszynski EW., Falk LA., Oppenheim JJ. & Keller JR. (1990). Transforming growth factor (IL-1) receptor expression: proposed mechanism of inhibition of IL-1 action. *J. Exp. Med.* **172**: 737-744.
- Dupont de Nemours EI. & Co. (Inc.) (1985) - *Protocols for electrophoretic and capillary transfer of DNA and RNA, and DNA and RNA rehybridation.*
- Ebaugh FG. Jr, Emerson CP. & Ross JF. (1953). The use of radioactive chromium 51 as an erythrocyte tagging agent for the determination of red cell survival *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **32**: 1260-1276.
- Emerson SG. (1990). The regulation of hematopoiesis in the human fetal liver. *Progress in clinical & Biological Research* **352**: 21-28.
- Feo CJ., Tchernia G., Subtil E. & Leblond PF. (1978). Observation of echinocytosis in eight patients: a phase contrast and SEM study. *Br. J. Haematol.* **40** (4): 519-526.
- Ferretti L. & Sgaramella V. (1981). Specific and reversible inhibition of the blunt end forming activity of the T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Res.* **9**: 3695-3705.
- FMC (1988) - *NuSieve GTG agarose: For separation and in-gel ligation-transformation of DNA (<1Kb)*, p.11-12.
- Foulds L. (1958). The Natural History of Cancer. *J. Chronic Dis.* **8**: 2-37.

- Frohman MA., Dush MK. & Martin GR. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8998-9002.
- Fung RHP. & Keung YK. & Chung GSH. (1969). Screening of pyruvate kinase deficiency and G6PD deficiency in Chinese newborn in Hong Kong. *Arch. Dis. Child.* **44**: 373-376.
- Gabbianelli M., Sargiacomo M., Pelosi E., Testa U., Isacchi G. & Peschle C. (1990). Pure human hematopoietic progenitors: permissive action of basic fibroblast growth factor. *Science* **249**: 1561-1564.
- Goldwasser E. (1975). Erythropoietin and the differentiation of red blood cells. *Fed. Proc.* **34**: 2285-2292.
- Gelfand DH. (1989). Taq DNA polymerase. Dans HA. Erlich (Ed.): *PCR Technology*, Mac Millan Publishers Ltd, U.K., p.17-30.
- Grimes AJ., Meisler A. & Dacie JV. (1964). Hereditary non-spherocytic haemolytic anaemia. A study of red cell carbohydrate metabolism in twelve cases of pyruvate kinase deficiency. *Br. J. Haemat.* **10**: 403-411.
- Guminska M., Wazewska T. & Czykewska M. (1979). Congenital non-spherocytic haemolytic anemia variants with primary and secondary pyruvate kinase deficiency. II. Enzymatic studies. *Br. J. Haematol.* **41**: 125-132.
- Gyllensten UB. & Erlich HA. (1988). Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7652-7656.
- Gyllensten U. (1989). Direct sequencing of *in vitro* amplified DNA. Dans HA. Erlich (Ed.): *PCR Technology*, Mac Millan Publishers Ltd, U.K., p.45-60.
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hardon E., Paonessa G., Frain M. & Cortese R. (1988). Two distinct factors interact with the promoter region of several liver-specific genes. *EMBO J.* **7**: 1711-1719.
- Higuchi R., Cecilia H., von Beroldingen CH., Sensabaugh GF. & Erlich HA. (1988). DNA typing from single hair. *Nature* **332**: 543-546.

- Higuchi R. (1989). Simple and rapid preparation of samples for PCR. Dans H.A.Erlich (Ed): *PCR Technology*, Mac Millan Publishers Ltd, U.K., p.31-38.
- Ieki R., Miwa S., Fujii H., Kudoh S., Kimura H. & Tanaku F. (1990). Patient with pyruvate kinase deficiency developed acute myelogenous leukemia. *Am. J. Mematol.* **34**: 64-68.
- Imamura K. & Tanaka T. (1982). Pyruvate kinase isozymes from rat. *Methods in enzymology* **90**: 150-165.
- Imamura K. & Tanaka T. (1972). Multimolecular forms of pyruvate kinase from rat and other mammalian tissues. *J. Biochem.* **71**: 1043-1048.
- Innis MA. & Gelfand DH (1990). Optimization of PCRs. Dans MA. Innis, DH. Gelfand, JJ. Sninsky & TJ. White (Ed.): *PCR protocols, a guide to methods and applications*, Academic Press Inc., New York, p.3-12.
- Jose-Estanoyl M. & Danan JL. (1988). A liver-specific factor and nuclear factor I bind to the rat alpha-fetoprotein promoter. *J. Biol. Chem.* **263**: 10865-10871.
- Kahn A., Marie J., Galand C. & Boivin P. (1976). Chronic haemolytic anemia in two patients heterozygous for erythrocyte pyruvate kinase deficiency. *Scand. J. Haematol.* **16**: 250-257.
- Kahn A., Cottreau D., Daegelen D. & Dreyfus JC. (1981a). Cell-free translation of messenger RNAs from adult and fetal human muscle. Characterization of neosynthesized glycogen phosphorylase, phosphofructokinase and glucose phosphate isomerase. *Eur. J. Biochim.* **116**, 7-12.
- Kahn A., Marie J., Vives-Corrans JL., Maigret P. & Najman A. (1981b). Search for a relationship between molecular anomalies of the mutant erythrocyte pyruvate kinase variants and their pathological expression. *Hum. Genet.* **57**: 172-175.
- Kahn A. (1988). L'amplification *in vitro* des fragments d'ADN par PCR (polymerase chain reaction): un tournant en génétique. *Médecine-Sciences* **8** (4): 515-518.
- Kanno H., Fujii H., Hirono A. & Miwa S. (1991). cDNA cloning of human R-type pyruvate kinase and identification of a single amino acid substitution (Thr<sup>384</sup>-Met) affecting enzymatic stability in a pyruvate kinase variant (PK Tokyo) associated with hereditary hemolytic anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8218-8221.

- Kanno H., Fujii H., Hirono A., Omine M. & Miwa S. (1992). Identical point mutations of the R-type pyruvate kinase (PK) cDNA found in unrelated PK variants associated with hereditary hemolytic anemia. *Blood* **79** (5): 1347-1350.
- Keitt AS. (1966). Pyruvate kinase deficiency and related disorders of red cell glycolysis. *Am. J. Med.* **41**: 762-785.
- Kite J. & Doolittle RF. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- Krantz SB. (1991). Erythropoietin. *Blood* **77** (3): 419-434.
- Kwok S. & Higuchi R. (1989). Avoiding false positive with PCR *Nature* **339**: 237.
- Larochelle A., De Braekeleer M., Marceau D. & de Médicis E. (1991). Hereditary non-spherocytic hemolytic anemia: a pyruvate kinase mutation in Quebec patients. Miami Bio/Technology Winter Symposium. *Miami Short Reports* **1**: 33.
- Larrick JW. (1992). Message amplification phenotyping (MAPPING) - Principles, practice and potential. *Trends in Biotechnology* **10** (5): 146-152.
- Leblond PF., Lyonnais J., Delage JM. & Coulombe L. (1978). Erythrocyte populations in pyruvate kinase deficiency anaemia following splenectomy. I. Cell morphology. II. Cell deformability. *Br. J. Haemat.* **39**: 55-61, 63-70.
- Lisardi PM. (1989). Binding and recovery of DNA and RNA using S&S NA45 DEAE membrane. Dans *Application update*, Schleidher & Schuell, New York.
- Lo Y-MD., Mehad WZ. & Fleming KA. (1988). False positive results and the polymerase chain reaction. *The Lancet* **2**: 679.
- Maire P., Wuarin J. & Schibler U. (1989). The role of cis-acting promoter elements in tissues - specific albumin gene expression. *Science* **244**: 343-346.
- Maniatis T., Fritsch EF. & Sambrook J. (1982). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NE, USA, p.77
- Matthews W., Jordan CT., Wiegand GW., Pardoll D. & Lemischka IR. (1991). A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* **65**: 1143-1152.

- Mentzer WC. Jr, Baehner RL., Schmidt-Schönbein H., Robinson SH. & Nathan DG. (1971). Selective reticulocyte destruction in erythrocyte pyruvate kinase deficiency. *J. Clin. Invest.* **50**: 688-699.
- Michalewicz R. & Revel M. (1987). Interferons regulate the *in vitro* differentiation of multilineage lympho-myeloid stem cells in hairy cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2307-2311.
- Mitelman F. (1986). Clustering of breakpoints to specific chromosomal regions in human neoplasia. A survey of 5345 cases. *Hereditas* **104**: 113-119.
- Miwa S. & Nagata M. (1965). Pyruvate kinase deficiency hereditary non-spherocytic hemolytic anemia. Report of two cases in a Japanese family and review of literature. *Acta Haematol. Jap.* **28**: 1.
- Miwa S. & Nishina T. (1974). Studies on pyruvate kinase (PK) deficiency. I. Clinical, hematological and erythrocyte enzyme studies. *Acta Haematol. Jpn.* **37**: 1-16.
- Miwa S., Nakashima K., Ariyoshi K., Shinohara K., Oda E. & Tanaka T. (1975). Four new pyruvate kinase (PK) variants and a classical PK deficiency. *Br. J. Haematol.* **29**: 157-169.
- Miwa S., Boivin P., Blume KG., Arnold H., Black JA., Kahn A., Staal GEJ., Nakashima K., Tanaka KR., Paglia DE., Valentine WN., Yoshida A. & Beutler E. (1979). International Committee for standardization in haematology. Recommended methods for the characterization of red cell pyruvate kinase variants. *Br. J. Haematol.* **43**: 275-286.
- Mount SM. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* **10** (2): 459-472.
- Mucenski ML., McLain K., Kier AB., Swerdlow SH., Schreiner CM., Miller TA., Pietryga DW., Scot WJ. Jr & Potter SS. (1991). A functional c-myc gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* **65**: 677-689.
- Muirhead H. (1990). Isoenzymes of pyruvate kinase. *Biochemical Society Transactions* **18**: 193-196.
- Nakao M., Nakao T., Tatibana M., Yoshikawa H. & Abe T. (1959). Effect of inosine and adenine on adenosine triphosphate regeneration and shape transformation in long stored erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **32**: 564-565.

- Nakashima K., Miwa S., Oda S, Imamura K, Tanaka T. & Nishina T. (1974). Electrophoretic and kinetic studies of mutant erythrocyte pyruvate kinases. *Blood* **43**: 537-543.
- Nathan DG., Oski FA., Sidel VW. & Diamond LK. (1965). Extreme hemolysis and red cell distorsion in erythrocytes pyruvate kinase deficiency. II. Measurements of erythrocyte glucose consumption, potassium flux and adenosine triphosphate stability. *N. Engl. J. Med.* **272**: 118-123.
- Neubauer B., Lakomek M., Winkler H., Parke M., Hofferbert S. & Schröter W. (1991). Point mutations in the L-type pyruvate kinase gene of two children with hemolytic anemia caused by pyruvate kinase deficiency. *Blood* **77** (9): 1871-1875.
- Newton CR., Kalsheker N., Graham A., Powell S., Gammack A., Riley J. & Markham AF. (1988). Diagnosis of  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency by enzymatic amplification of human genomic DNA and direct sequencing of polymerase chain reaction products. *Nucleic Acids Res.* **16**: 8233-8243.
- Nicola NA. & Metcalf D. (1991). Subunit promiscuity among hematopoietic growth factor receptors. *Cell* **67**: 1-4.
- Noguchi T., Inoue H. & Tanaka T. (1986). The M<sub>1</sub>- and M<sub>2</sub>-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *J. Biol. Chem.* **261**: 13807-13812.
- Noguchi T., Yamada K., Inoue H., Matsuda T. & Tanaka T. (1987). The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. *J. of Biol. Chem.* **262** (29): 14366-14371.
- Ohta C., Katayama N., Uno N., Minami N., Karitani Y. & Shirakawa S. (1984). A case of familial pyruvate kinase deficiency associated with acute myelomonocytic leukemia. *Rinsho Ketsueki* **25**: 75-81.
- Oski FA., Nathan DG., Sidel VW. & Diamond LK. (1964). Extreme hemolysis and red cell distorsion in erythrocyte pyruvate kinase deficiency. I. Morphology, erythrokinetics and family enzyme studies. *N. Engl. J. Med.* **270**: 1023-1030.
- Paglia DE., Valentine WN, Baughan MA., Miller DR., Reed CF. & McIntyre OR. (1968). An inherited molecular lesion of erythrocyte pyruvate kinase. Identification of a kinetically aberrant isozyme associated with premature hemolysis. *J. Clin. Invest.* **47**: 1929-1946.

Pain B., Woods CM., Saez J., Flickinger T., Raines M., Peyrol S., Moscovici MG., Kung HJ., Jurdic P. & al (1991). EGF-R as a hematopoietic growth factor receptor: the c-erbB product is present in chicken erythrocytic progenitors and control their self-renewal. *Cell* **65**: 37-46.

Pharmacia LKB Biotechnology Instructions (New Revised Edition) - *<sup>17</sup>Sequencing Mixes*.

Pharmacia LKB Biotechnology Instructions (1990a) - *Deaza <sup>17</sup>Sequencing Mixes*.

Pharmacia LKB Biotechnology Instructions (1990b) - *Oligolabelling kit*.

Pommier G. (1992). Facteurs de croissance et cancers intestinaux. *Bull. Cancer* **79**: 427-449.

Ponder E. (1948). *Hemolysis and related phenomena*. Grune et Stratton, New York.

Promega Technical Manual (Août 1988) - *Taqtrack Sequencing System*.

Robinson MA., Loder PB. & De Gruchy GC. (1961). Red-cell metabolism in non-spherocytic congenital haemolytic anaemia. *Br. J. Haematol.* **7**: 327-339.

Rodu R. (1990). Molecular biology in medicine, the polymerase chain reaction. The revolution within. *Am. J. of the Medical Sciences* **299** (3):210-216.

Ruskin B., Krainer AR., Maniatis T. & Green MR. (1984). Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing *in vitro*. *Cell* **38**: 317-331.

Saïki RK., Scharf S., Falcona F., Mullis KB., Horn GT., Erlich HA. & Arnheim N.(1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin. *Science* **230**: 1350-1354.

Saïki RK., Gelfand DH., Stoffel S., Scharf SJ., Higuchi R., Horn GT., Mullis KB. & Erlich HA. (1988). Primer-directed amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

Sambrook J., Fritsch EF. & Maniatis T. (1989a). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2<sup>e</sup> édition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p.11.23-11.28.

Sambrook J., Fritsch EF. & Maniatis T. (1989b). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2<sup>e</sup> édition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p.1.70-1.71.

Sambrook J., Fritsch EF. & Maniatis T. (1989c). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2<sup>e</sup> édition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p.1.25-1.28.

Sambrook J., Fritsch EF. & Maniatis T. (1989d). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2<sup>e</sup> édition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1.38-1.39.

Sambrook J., Fritsch EF. & Maniatis T. (1989e). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2<sup>e</sup> édition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p.E.18-E.19.

Sanger F., Nicklen S. & Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **12**: 5436-5467.

Sarkar G. & Sommer SS. (1989). Access to a messenger RNA sequence or its protein product is not limited by tissues or species specificity. *Science* **244**: 331-334.

Sarkar G. & Sommer SS. (1990). Shedding light on PCR contamination. *Nature* **343**:27.

Satoh H., Tani K., Yoshida MC., Sasaki M., Miwa S. & Fujii H. (1988). The human liver-type pyruvate kinase gene is on chromosome 1 at band q21. *Cytogen. Cell Genet.* **47**: 132-133.

Sawadogo M. & Roeder R. (1985). Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* **43**: 165-175.

Sawyers CL., Denny CT. & Witte ON. (1991). Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell* **64** (2): 337-350.

Schorpp M., Kugler W., Wagner U. & Ryffel GU. (1988). Hepatocyte-specific promoter element HP1 of the *Xenopus* albumin gene interacts with transcriptional factors of mammalian hepatocytes. *J. Mol. Biol.* **202**: 307-320.

Scröter W. (1972). Clinical heterogeneity of erythrocyte pyruvate kinase deficiency. *Helv. Paediatr. Acta* **27**: 471-488.

Sellner LN., Coelen RJ. & Mackenzie JS. (1992). Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucleic Acid Research* **20** (7): 1487-1490.

- Selwyn JG. & Dacie JV. (1954). Autohemolysis and other changes from the incubation *in vitro* of red cells from patients with congenital hemolytic anemia. *Blood* **9**: 414-438.
- Southern EM. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Staal GEJ, Rijksen G., Vlug AMC., Vromen-van den Bos B., Akkerman JWN., Gorter G., Dierick J. & Petermans (1982). Extreme deficiency of L-type pyruvate kinase with moderate clinical expression. *Clin. Chim. Acta* **118** (2-3): 241-253.
- Stratagene Instruction Manual (April 22, 1991) - *pBluescript II Exo/Mung DNA sequencing system*.
- Stryer L. (1988). *Biochemistry*, 3<sup>e</sup> éd., W.H. Freeman, New York, p.98.
- Takenaka M., Noguchi T., Sadahiro S., Hirai H., Yamada K., Matsuda T., Imai E. & Tanaka T. (1991). Isolation and characterization of the human pyruvate kinase M gene. *Eur. J. Biochem.* **198**: 101-106.
- Tanaka KR., Valentine WN. & Miwa S. (1962). Pyruvate kinase (PK) deficiency hereditary non-spherocytic hemolytic anemia. *Blood* **19**: 267-295.
- Tanaka T., Harano Y., Sue F. & Morimura H. (1967). Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinase isolated from rat tissues. *J. Biochem.* **62**: 71-91.
- Tanaka KR. & Paglia DE. (1971). Pyruvate kinase deficiency. *Semin. Hematol.* **8**: 367-396.
- Tani K., Fujii H., Nagata S. & Miwa S. (1988a). Human liver type pyruvate kinase: complete amino acid sequence and the expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1792-1795.
- Tani K., Yoshida MC., Satoh H., Mitamura K., Noguchi T., Tanaka T., Fujii H. & Miwa S. (1988b). Human M<sub>2</sub>-type pyruvate kinase: cDNA cloning, chromosomal assignment and expression in hepatoma. *Gene* **73**: 509-516.
- Tani K., Fujii H., Takahashi K., Kodo H., Asano S., Takaku F. & Miwa S. (1989). Erythrocyte enzyme activities in myelodysplastique syndromes: elevated pyruvate kinase activity. *Am. J. Hematol.* **30**: 97-103.

- Thein SL. & Wallace RB. (1986). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. Dans KE. Davis (Ed.): *Human Genetic Diseases*, IRL Press, Washington, DC., p.33-50.
- Thompson KS. & Towle HC. (1991). Localization of the carbohydrate response element of the rat L-type pyruvate kinase gene. *J. Biol. Chem.* **266** (14): 8679-8682.
- Till JE. & McCulloch EA. (1980). Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* **605**: 431-459.
- Tindall KR. & Kunkel TA. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008-6013.
- Tovey MG., Streuli M., Gresser I., Gugenheim J., Blanchard B., Guymarho J., Vignaux F. & Gigou M. (1987). Interferon messenger RNA is produced constitutively in the organs of normal individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5038-5048.
- Tse WT. & Forget BG. (1990). Reverse transcription and direct amplification of cellular RNA transcripts by Taq polymerase. *Gene* **88** (2): 293-296.
- Ullrich A. & Schlessinger J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212.
- Valentine WN., Tanaka KR. & Miwa S. (1961). A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect (pyruvate kinase) in three subjects with congenital non-spherocytic hemolytic anemia. *Trans. Assoc. Am. Physicians* **74**: 100-110.
- Valentine WN., Tanaka KR. & Paglia DE. (1985). Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies. *Annals of Internal Medicine* **103**: 245-257.
- Valentine WN., Tanaka KR. & Paglia DE. (1989). Pyruvate kinase and other enzyme deficiency disorders of the erythrocyte. Dans Scriver CR., Beaudet AL., Sly WS. & Valle D. (Ed.): *The Metabolic Basis of Inherited Diseases II*, Mc Graw Hill, New York, p.2341-2365.
- Van Berkel TJC., Koster JF. & Staal GEJ. (1973). On the molecular basis of pyruvate kinase deficiency. I. Primary defect or consequence of increased glutathion disulfide concentration. *Biochim. Biophys. Acta* **321**: 496-502.
- Vaulont S., Puzenat N., Levrat F., Cognet M., Kahn A. & Raymondjean M. (1989). Proteins binding to the liver-specific pyruvate kinase gene promoter. A unique combination of known factors. *J. of Mol. Biol.* **209**: 205-219.

Vaulont S., Munnich A., Decaux JF. & Kahn A. (1986). Transcriptional and post-transcriptional regulation of the L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. *J. Biol. Chem.* **261** (17): 7621-7625.

Velan B., Cohen S., Grosfeld H., Leitner M. & Shafferman A. (1985). Bovine interferon  $\alpha$  genes, structure and expression. *J. Biol. Chem.* **260**: 5498-5504.

Vives-Corrons JL., Florensa L., Muncunill J., Nomdebeu B. & Rozman C. (1979). Chronic myelomonocytic leukemia associated with hereditary pyruvate kinase deficiency and multiple acquired erythrocyte abnormalities. *Acta haemat.* **61**: 168-174.

Vogt VM. (1973). Purification and further properties of single-stranded-specific nuclease from *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.* **33**: 192-200.

Wallace RB. & Miyada CG. (1989). Oligonucleotide probes for the screening of recombinant DNA libraries. *Meth. Enzymol.* **152**: 432-442.

Weinstein IB. (1988). The origins of the human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment - Twenty-seventh G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Research* **48**: 4135-4143.

Welsh J. & McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7213-7218.

Wendling F. & Tambourin P. (1991). La superfamille des récepteurs de cytokines et l'oncogène v-mpl. *Médecine-Sciences* **7**: 569-577.

Westhead EW., Kiener PA., Carroll D. & Gikner J. (1984). Control of oxygen delivery from the erythrocyte by modification of pyruvate kinase. *Current Topics in Cellular Regulation* **24**: 21-34.

White JG. (1976). Scanning electron microscopy of erythrocyte deformation. The influence of a calcium ionophore, A23187. *Semin. Hematol.* **13** (2): 121-131.

Williams JGK., Kubelik AR., Livak KJ., Rafalskj JA. & Tingey SV. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.

Winship PR. (1989). An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulfoxide. *Nucleic Acid res.* **17** (3): 1266.

Wintrobe MM. (1990a). *Hématologie clinique*. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padoue, p.84-119.

Wintrobe MM. (1990b). *Hématologie clinique*, Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padoue, p.2126.

Wintrobe MM. (1990c). *Hématologie clinique*. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padoue, p.191-214.

Wintrobe MM (1990d). *Hématologie clinique*. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padoue, p.830-853.

Wintrobe MM. (1990e). *Hématologie clinique*. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padoue, p.875-889.

Witte ON. (1990). Steel locus defines new multipotent growth factors [published erratum appears in *Cell* 1990 Nov. 30; **63** (5): following 1112]. *Cell* **63**: 5-6.

Wrischnik LA., Higuchi RG., Stoneking M. Erlich HA, Arnheim N. & Wilson AC. (1987). Length mutations in human mitochondrial DNA: direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *Nucleic Acids Res.* **15**: 529-542.

Yamada K., Noguchi T., Matsuda T., Takanaka M., Monaci P., Nicosia A. & Tanaka T. (1990). Identification and characterization of hepatocyte-specific regulatory regions of the rat pyruvate kinase L gene - The synergistic effects of multiple elements. *J. Biol. Chem.* **265** (32): 19885-19891.

Youssoufian H., Kazazian HH. Jr., Philips DG., Aronis S., Tsiftis G., Brown VA. & Antonarakis SE. (1986). Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hot-spots. *Nature* **324**: 380-382.

Zachée P., Staal GE., Rijksen G., De Bock R., Couttenye MM. & De Broe ME. (1989). Pyruvate kinase deficiency and delayed clinical response to recombinant human erythropoietin treatment. *The Lancet* **1**: 1327-1328.

Zanella A., Rebulli P., Vullo C., Izzo C., Tedesco F. & Sirchia G. (1978). Hereditary pyruvate kinase deficiency: role of the abnormal enzyme in red cell pathophysiology. *Br. J. Haematol.* **40**: 551-562.

Zanella A., Rubella P., Giovanetti AM., Curzio M., Pescarmona GP. & Sirchia (1976). Effects of sulphhydryl compounds in abnormal red cell pyruvate kinase. *Br. J. Haematol.* **32**: 373-386.

Zuelzer WN., Robinson AR. & Hsu THJ (1968). Erythrocyte pyruvate kinase deficiency in non-spherocytic hemolytic anemia: a system of multiple genetic markers. *Blood* **32**: 33-48.

# APPENDICES

## 1. Articles

Larochelle A., Marceau D. & de Médicis E. (1992). Leucocytic DNA rearrangements in three cases of hereditary hemolytic anemia. En préparation.

Larochelle A., Leclerc J., Marceau D. & de Médicis E. (1992). Genetic and enzymatic characterization of the erythrocytic pyruvate kinase of a patient with hereditary hemolytic anemia (PK-Quebec). En préparation.

## 2. Communications

Larochelle A. & de Médicis E. (1991). Identification de marqueurs génétiques associés à l'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire par déficience en pyruvate kinase. *Médecine-Sciences* **6 suppl. 1**: 34

Larochelle A. & de Médicis (1991). Déficience en pyruvate kinase érythrocytaire. *Annales de l'ACFAS* **59**, 23.

Larochelle A., De Braekeleer M., Marceau D. & de Médicis E. (1991). Hereditary non-spherocytic hemolytic anemia: a pyruvate kinase mutation in Quebec patients. *Miami Short Reports* **1**: 33.

de Médicis E. & Larochelle A. (1991). DNA rearrangements in congenital non-spherocytic hemolytic anemia patients with pyruvate kinase deficiency. *Proc. Can. Fed. Biol. Soc.* **34**: 170.

Larochelle A. & de Médicis E. (1991). Identification de marqueurs génétiques associés à l'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire par déficience en pyruvate kinase. *Journée scientifique de l'Université de Sherbrooke* **20**: 19.

de Médicis E., Larochelle A., Leclerc J., Marceau D. (1992). Caractérisation enzymatique et génétique de la pyruvate kinase érythrocytaire d'un patient déficient qui est atteint d'anémie hémolytique héréditaire (PK-Québec). *Médecine-Sciences* **8 suppl. 2**: 24.