

Erythroenzymopathies : modèle d'études coordonnées par biochimie et biologie moléculaire

De nombreuses érythroenzymopathies ont été décrites depuis la mise à jour des déficits en glucose-6-phosphate déshydrogénase et en pyruvate kinase. Elles touchent principalement les enzymes de la voie glycolytique d'Embden Meyerhof, de la voie des pentoses-phosphates et les enzymes du métabolisme des nucléotides. L'hémolyse est le symptôme le plus fréquent, due à un déficit en ATP ou en NADPH. A l'inverse, les déficits en 2,3 diphosphoglycérate (déficits en diphosphoglycérate mutase ou hyperactivité de la pyruvate kinase) entraînent une polyglobulie, réactionnelle à l'augmentation de l'affinité des globules rouges pour l'oxygène. La plupart des gènes codant pour ces enzymes ont maintenant été clonés, permettant l'étude des relations structure/fonction.

Raymonde Rosa

ADRESSE

R. Rosa : maître de conférence des universités, praticien hospitalier. Inserm U.91, hôpital Henri Mondor, 51, avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, 94010 Créteil, France.

TIRÉS A PART

R. Rosa.

La pathologie d'origine génétique des enzymes érythrocytaires se traduit le plus souvent par des anémies hémolytiques mais parfois par des polyglobulies. Les enzymopathies érythrocytaires représentent une pathologie importante : plusieurs millions de personnes en sont atteintes dans le monde, et des enzymes variées ont été identifiées comme pouvant être à l'origine de ces maladies. Elles avaient constitué jusqu'au début des années 1980 un modèle d'étude privilégié de pathologie métabolique. Depuis quelques années, leur investigation a été totalement transformée par les apports de la biologie moléculaire. C'est en 1956 que fut découverte la première enzymopathie de l'érythrocyte, le déficit en glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD) [1]. C'était l'aboutissement de toute

une série de recherches sur l'origine des crises d'hémolyse aiguë, survenant chez des sujets traités préventivement par des antipaludéens de synthèse [2]. Quelques années plus tard, en 1961, fut décrite par W.N. Valentine la première enzymopathie érythrocytaire de la voie principale de la glycolyse, le déficit en pyruvate kinase [3], associé à une anémie hémolytique chronique. Depuis, toute une série de découvertes ont eu lieu, impliquant différentes enzymes de l'érythrocyte, principalement celles qui interviennent dans la dégradation du glucose. Les principales enzymopathies érythrocytaires décrites jusqu'à présent sont résumées dans plusieurs revues dont nous signalons quelques-unes des plus récentes [4-8]. A l'exception des déficits en G6PD et en phosphoglycérate kinase qui sont liés au sexe, la plupart des déficits enzyma-

tiques érythrocytaires sont génétiquement transmis selon le mode autosomique récessif, et les hétérozygotes sont cliniquement indemnes. Seuls sont atteints les homozygotes, issus pour la plupart de parents consanguins, et les hétérozygotes composites dont les gènes alléliques de l'enzyme sont porteurs de deux mutations différentes (ce qui semble être beaucoup plus fréquent qu'on ne le croyait, à mesure qu'on peut déterminer la structure des enzymes mutées).

Si les enzymes participant à la glycolyse sont particulièrement impliquées dans la pathologie du globule rouge, c'est que ce dernier puise son énergie presque essentiellement dans la glycolyse (figure 1). D'autres voies métaboliques sont, certes, aussi impliquées dans les enzymopathies de l'érythrocyte, mais elles sont apparemment moins nombreuses. L'érythrocyte mûr est une cellule qui ne possède ni noyau ni mitochondries. Une grande partie des enzymes du métabolisme cellulaire qui existent dans l'érythroblaste disparaissent au cours de la maturation de l'érythrocyte. De ce fait, il lui est impossible de renouveler ses enzymes en synthétisant de nouvelles molécules, et ses métabolismes s'en trouvent considérablement réduits. Certaines enzymes appartenant à des voies métaboliques ayant disparu de la cellule mûre sont cependant encore décelables dans le globule rouge. Elles peuvent subir des mutations qui, sans conséquence pour l'érythrocyte lui-même, peuvent entraîner un syndrome pathologique dans d'autres tissus. La mesure de leur activité dans le globule rouge permet alors de faire le diagnostic.

Les érythroenzymopathies hémolytiques

Parmi les érythroenzymopathies, celles qui sont à l'origine d'une hémolyse sont les plus nombreuses. Elles résultent d'un dysfonctionnement de la membrane érythrocytaire, consécutif à la perturbation d'une voie métabolique. L'hémolyse survient parfois dès la naissance sous forme d'ictère néonatal, se poursuivant ou non par une anémie hémom/s n° 11 vol. 9, novembre 93

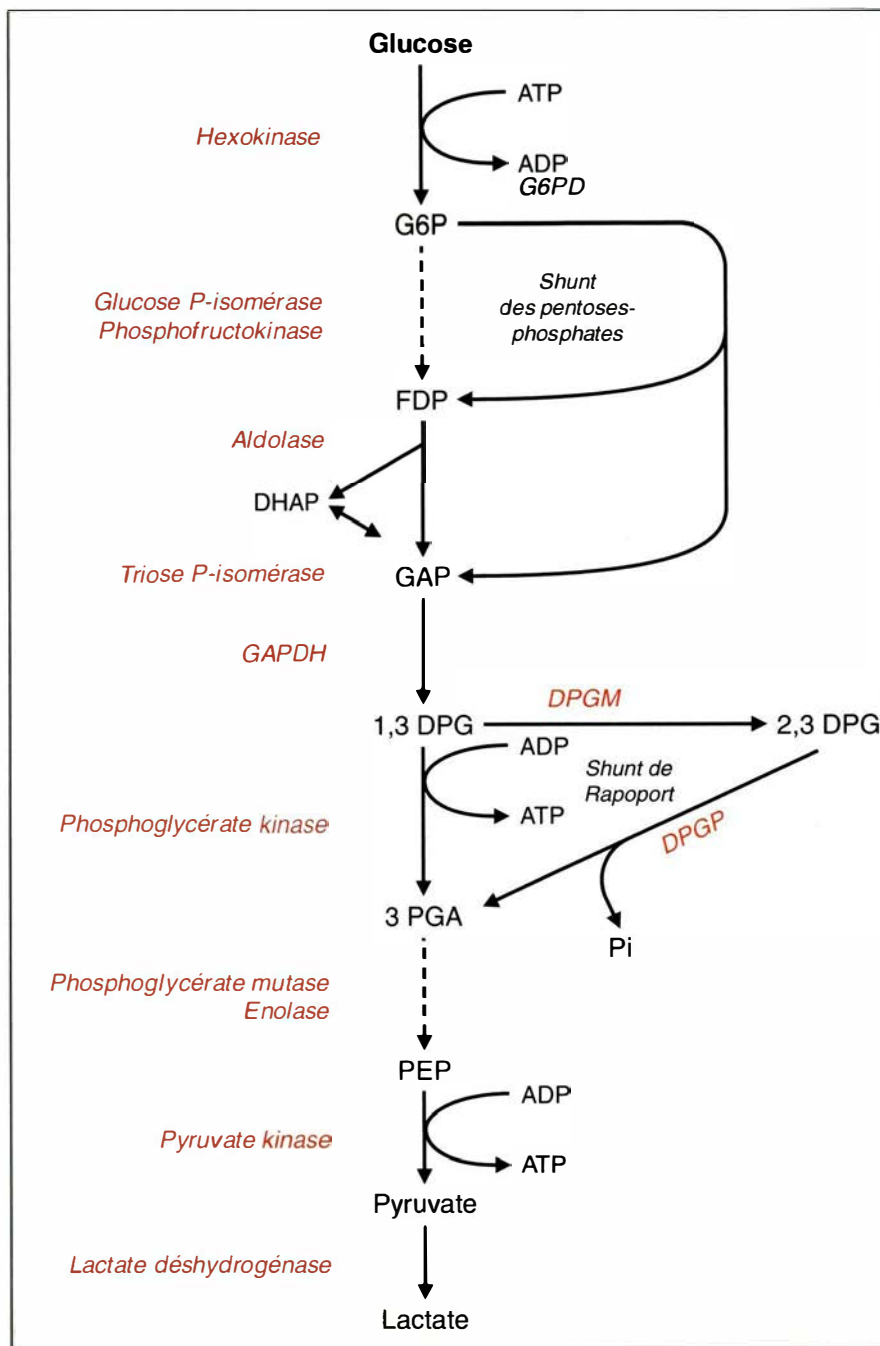


Figure 1. **Schéma simplifié de la glycolyse.** G6P, glucose 6-phosphate ; FDP, fructose 1,6-diphosphate ; Pi, phosphate inorganique ; DHAP, dihydroxyacétone phosphate ; GAP, glycéraldéhyde 3-phosphate ; 1,3-DPG, 1,3 diphosphoglycérate ; ADP, adénosine diphosphate ; ATP, adénosine triphosphate. 3-PGA, 3 phosphoglycérate ; PEP, phosphoénol pyruvate ; 2,3-DPG, 2,3-diphosphoglycérate ; GAPDH, glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase. L'ATP, presque totalement fourni par la glycolyse dans l'érythrocyte, est nécessaire à certaines enzymes membranaires, dont les ATPases, qui participent au maintien de l'équilibre ionique entre le plasma et la cellule. Un taux d'ATP trop réduit aura pour conséquence un mauvais fonctionnement de ces enzymes, aboutissant à une hémolyse.

RÉFÉRENCES

1. Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE, Alving AS. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 1956; 124: 484-5.
2. Beutler E. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. New York: Plenum Medical, 1978: 23-167.
3. Valentine W, Tanaka KR, Miwa S. A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect (pyruvate kinase) in three subjects with congenital non-spherocytic hemolytic anemia. *Trans Assoc Am Physicians* 1961; 74: 100-10.
4. Valentine WN. Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies. *Ann Intern Med* 1985; 103: 245-57.
5. Miwa S. Molecular basis of red cell enzymopathies associated with hereditary non spherocytic anemia. *Haematologia* 1989; 22: 215-31.
6. Valentine WN, Tanaka KR, Paglia DE. Pyruvate kinase and other enzyme deficiency disorders of the erythrocyte. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly VS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*, New York: Mc Graw-Hill, 6th ed. 1989: 2341-65.
7. Tanaka KR, Zerez CR. Red cell enzymopathies of the glycolytic pathway. *Semin Hematol* 1990; 27: 165-85.
8. Rosa R. Anémies hémolytiques constitutionnelles par déficits enzymatiques érythrocytaires. In: Breton-Gorius J, Reyes F, Rochant H, Rosa J, Vernant JP, eds. *L'hématologie de Bernard Dreyfus*, Paris: Flammarion, 1992: 410-24.
9. Kahn A, Kaplan JC, Dreyfus JC. Advances in hereditary red cell anomalies. *Hum Genet* 1979; 50: 1-27.
10. Rosa R, Préhu MO, Calvin MC. Possibility of prenatal diagnosis of hereditary triosephosphate isomerase deficiency. *Prenat Diagn* 1986; 6: 231-4.
11. Mohrenweiser HW, Fielek S. Elevated frequency of carriers for triosephosphate isomerase deficiency in new-born infants. *Pediatr Res* 1982; 16: 960-3.
12. Fujii H, Miwa S. Recent progress in the molecular genetic analysis of erythroenzymopathies. *Am J Hematol* 1990; 34: 301-10.
13. Puzenat N, Vaulont S, Kahn A, Raymondjean M. Combinatorial crosstalk of transacting factors binding to the L-type pyruvate kinase promoter elements analyzed *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 1119-28.

lytique chronique, souvent jalonnée d'épisodes aigus. Ces enzymopathies sont généralement classées selon le métabolisme qu'elles altèrent. Dans de nombreux cas, c'est la défaillance de la glycolyse ou du métabolisme des nucléotides qui, par insuffisance d'ATP, fragilisera la cellule. Paradoxalement, cette diminution de production d'ATP peut parfois résulter de l'hyperactivité d'une enzyme. C'est le cas de l'adénosine désaminase (figure 2).

De toutes les enzymopathies érythrocytaires, celles de la voie principale de la glycolyse (ou voie d'Embden Meyerhof) sont les plus nombreuses. Le Tableau I résume les caractères des principales érythroenzymopathies. Le déficit en pyruvate kinase [9] est, parmi les déficits de la glycolyse, le plus répandu et le mieux connu. Les déficits en glucose-phosphate isomérase sont bien moins fréquents que ceux de la pyruvate kinase érythrocytaire mais sont plus souvent découverts

que les autres enzymopathies de la voie d'Embden-Meyerhof.

Toutes ces enzymopathies présentent peu ou pas de spécificités cliniques, et le meilleur — et souvent le seul — moyen de les déceler et de les distinguer est la mesure de l'activité de l'enzyme. Cette mesure se fait sur hémolysat en se référant à la concentration de l'hémoglobine ou au nombre de globules rouges. Certaines modifications des concentrations de métabolites peuvent néanmoins étayer le diagnostic. Par exemple la concentration élevée de 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG) et la baisse de l'ATP viennent souvent confirmer un diagnostic hésitant de déficit en pyruvate kinase érythrocytaire [4]. En revanche, la baisse simultanée du 2,3-DPG et de l'ATP accompagnera le plus souvent un déficit en hexokinase ou en phosphofructokinase [7]. Ces déficits enzymatiques sont associés à une anémie hémolytique chronique qui peut être soit isolée (c'est le cas de

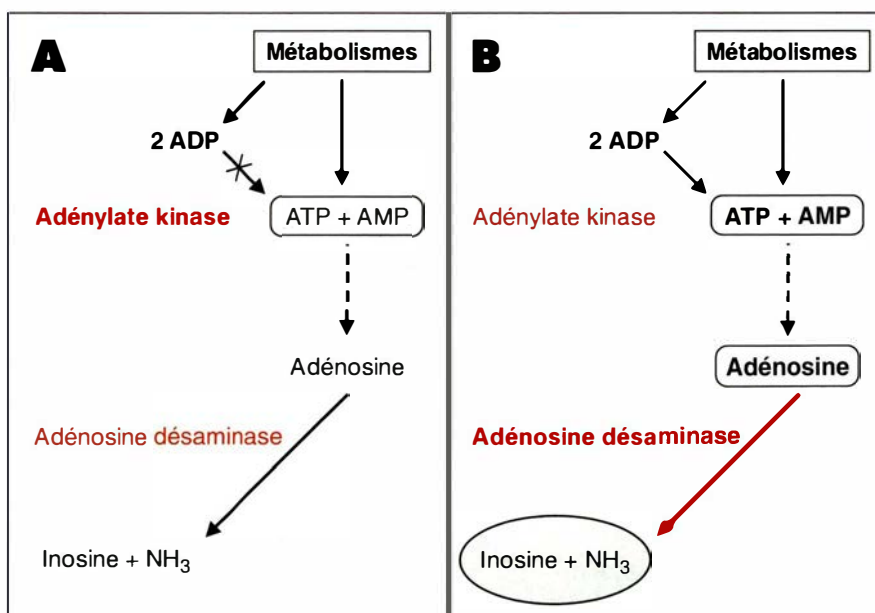


Figure 2. **Mécanismes responsables de la diminution d'ATP dans le déficit en adénylate kinase (A) et dans l'hyperactivité en adénosine désaminase (B).** A. Le déficit en adénylate kinase se traduit directement par une diminution de formation d'ATP. B. La quantité d'ATP formée est normale. L'hyperactivité (très rare) de l'adénosine désaminase entraîne une dégradation beaucoup plus rapide de l'ATP, avec pour conséquence une diminution d'ATP. Cette hyperactivité résulte de l'hyperproduction de l'enzyme dont la structure et les caractères ne sont pas modifiés. La mutation est probablement située sur le système régulateur du gène de l'enzyme. La transmission de l'enzymopathie est dominante (dans les cas publiés jusqu'ici).

la majorité des déficits de la voie d'Embden-Meyerhof), soit associée à des signes d'atteinte d'autres tissus. L'hémolyse peut être associée à d'autres symptômes si l'enzyme est monogénique et formée d'un seul type de chaîne. Dans ce cas, l'enzyme mutée est ubiquitaire et tous les tissus peuvent être atteints par le déficit fonctionnel. Le déficit en triosephosphate isomérase [6] en est un exemple. Enzymopathie extrêmement sévère avec des atteintes tissulaires multiples (neuromusculaire, cardiaque, du système immunitaire), survenant très tôt après la naissance de l'enfant qui atteint rarement l'âge adulte, la sévérité de ce déficit justifie l'indication d'un diagnostic prénatal. D'abord effectué sur le sang du fœtus après 20 semaines de grossesse [10], le diagnostic prénatal du déficit en triosephosphate isomérase a été mis au point et effectué sur le trophoblaste (12 semaines de grossesse) par la technique de la PCR, en se référant à la séquence nucléotidique dont la mutation, déjà identifiée chez plusieurs sujets atteints, avait été trouvée chez les parents de l'enfant (résultats personnels non publiés). Ce déficit en triosephosphate isomérase est probablement plus fréquent que ne le laisse penser le petit nombre de publications qui en font état. Une étude systématique a en effet montré un pourcentage important d'hétérozygotes dans une population donnée [11], ce qui suggère que la rareté des homozygotes pourrait être la conséquence de la létalité *in utero*.

Les enzymes peuvent être constituées de chaînes différentes, formant des isoenzymes qui s'expriment dans les différents tissus ou organes. Des mutations peuvent entraîner des désordres pathologiques dans l'un ou l'autre des tissus. Il en est ainsi de la phosphofructokinase qui s'exprime sous deux types, M et L. Le type M est majoritaire dans le muscle et le type L dans le foie, les deux types étant également exprimés dans l'érythrocyte. Le déficit en phosphofructokinase, ou maladie de Tarui (encore appelée glycogénose de type VII), fait partie des myopathies métaboliques et provient d'une mutation sur le gène de la phospho-

fructokinase de type M. Ce déficit est caractérisé par des symptômes musculaires et une hémolyse. Dans d'autres cas d'enzymopathies musculaires, si l'isoenzyme est peu ou non représentée dans l'érythrocyte, celui-ci ne sera pas atteint par l'enzymopathie. C'est ainsi qu'un déficit du type M de la phosphoglycérate mutase, ou de la lactate déshydrogénase [12], n'affecte pas l'érythrocyte mais provoque un syndrome musculaire. Il ne sera décelé que dans le tissu musculaire. En revanche, le déficit en pyruvate kinase R se traduit uniquement par une hémolyse

parce que l'anomalie atteint le type spécifique du globule rouge qui n'est présent que dans cette seule cellule. La pyruvate kinase s'exprime en effet dans les tissus sous forme de quatre isoenzymes: M1 spécifique du muscle, M2 présente dans la plupart des tissus, L spécifique du foie et R spécifique de l'érythrocyte. Les types L et R sont codés par le gène L et un promoteur spécifique de chacun des tissus est utilisé pour synthétiser des ARNm différant seulement par la séquence de leur extrémité 5' [12]. La régulation de l'expression du type R de la pyru-

Enzymes	Fréquence	Signes particuliers
<i>Voie d'Embden-Meyerof</i>		
hexokinase	rare	hém.
glucose-phosphate isomérase	assez fréquente	hém.
phosphofructokinase	rare	hém. + s. musculaires
aldolase	très rare	hém.
triosephosphate isomérase	rare ?	hém. + s. neurol., card. infect. etc...
glycéraldéhyde phosphate-déshydrogénase	très rare	hém.
phosphoglycérate kinase	rare	hém. ± s. neurol. ou s. musculaires
diphosphoglycérate mutase	très rare	polyglobulie
pyruvate kinase	fréquent	hém.
déficit hyperactivité*	rare	polyglobulie
<i>Shunt des pentoses-phosphates</i>		
glucose 6-phosphate déshydrogénase	fréquent	hém. médicament. C. Heinz
enzymes du métabolisme du glutathion	rare	hém. médic., C. Heinz ± s. neurol.
<i>Métabolisme des nucléotides</i>		
adénylate kinase	très rare	hém.
hyperactivité de l'ADA	rare	hém.
pyrimidine-5' nucléotidase	rare ?	hém. + ponct. bas.
cytochrome b5 réductase (méthémoglobine réductase)	rare	méthémoglobinémie ± arriér. mentale

* L'hyperactivité de la pyruvate kinase a des conséquences métaboliques inverses de celles qu'on observe dans le déficit, à savoir une baisse du 2,3-DPG au lieu d'une augmentation. Ses conséquences cliniques sont également inverses puisqu'elle aboutit à une polyglobulie au lieu de l'hémolyse consécutive au déficit en pyruvate kinase. L'abaissement du taux de 2,3-DPG des deux types d'anomalies (hyperactivité pyruvate kinase et déficit en diphosphoglycérate mutase) a pour corollaire une augmentation conséquente du taux d'ATP.
hém.: hémolyse; C. Heinz: corps de Heinz; ADA: adénosine désaminase.

RÉFÉRENCES

14. Max-Audit I, Eleouet JF, Roméo PH. Transcriptional regulation of the pyruvate kinase erythroid specific promoter. *J Biol Chem* 1993 (sous presse).

15. Miwa S, Kanno H, Fuji H. Concise review. Pyruvate kinase deficiency. Historical perspective and recent progress of molecular genetics. *Am J Hematol* 1993; 42: 31-5.

16. Rosa R, George C, Fardeau M, Calvin MC, Rapin M, Rosa J. A new case of phosphoglycerate kinase deficiency: PGK Créteil associated with rhabdomyolysis and lacking hemolytic anemia. *Blood* 1982; 60: 84-91.

17. Fujii H, Kanno H, Hironno A, Shimura T, Miwa S. A single aminoacid substitution (157 Gly/Val) in a phosphoglycerate kinase variant (PGK Shizuoka) associated with chronic hemolysis and myoglobinuria. *Blood* 1992; 79: 1582-5.

18. Luzzato I, Mehta A. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly VS, Valle D eds. *The metabolic basis of inherited disease*. New York: Mc Graw-Hill, 6th ed 1989: 2237-65.

19. Beutler E. The genetics of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Semin Hematol* 1990; 27: 137-64.

20. Beutler E. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *N Engl J Med* 1991; 324: 169-74.

21. Takizawa T, Huang IY, Ikuta T, Yoshida A. Human glucose 6-phosphate dehydrogenase: primary and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4157-61.

22. Persico MG, Viglietto G, Martino G, et al. Isolation of human glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' coding region. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 2511-22.

23. Beutler E. Study of glucose-6-phosphate dehydrogenase: history and molecular biology. *Am J Hematol* 1993; 42: 53-8.

24. Hirono A, Kuhl W, Gelbart T, Forman L, Fairbanks VF, Beutler E. Identification of the binding domain for NADP of human glucose-6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 10015-7.

25. Max-Audit I, Rosa R, Marie J. Pyruvate kinase hyperactivity genetically determined: metabolic consequences and molecular characterization. *Blood* 1980; 56: 902-9.

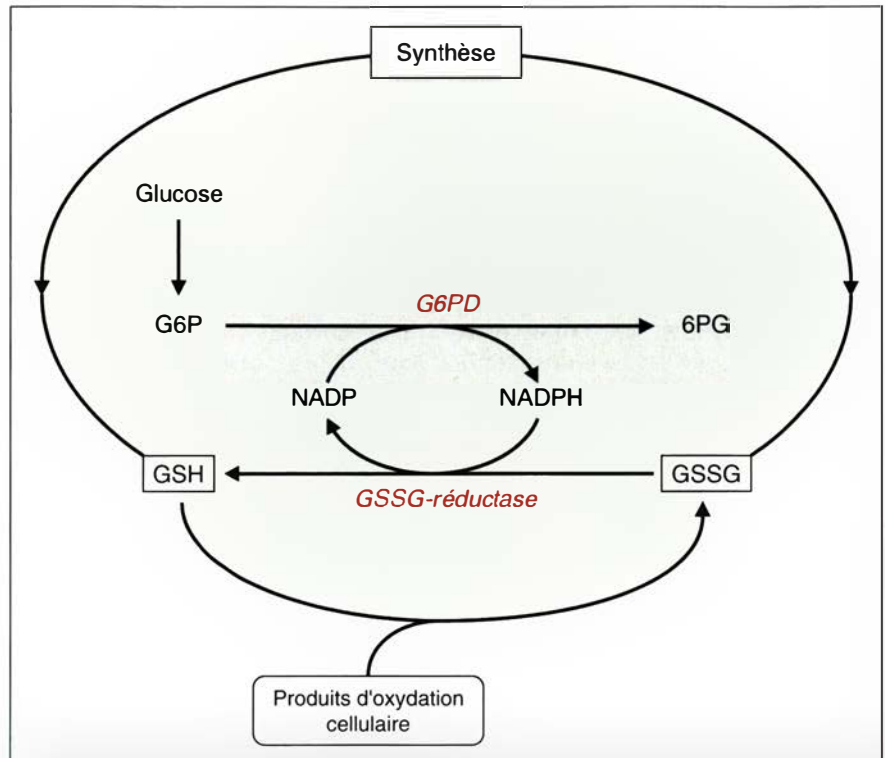


Figure 3. **Rapports entre le système GSH et le shunt des pentoses phosphates.** Le NADPH formé par l'action de la G6PD permet la transformation permanente du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH). GSSG est synthétisé puis transformé en GSH à l'aide du NADPH formé par la G6PD (6PG: 6-phosphogluconate). Les produits d'oxydation cellulaire vont à nouveau former du GSSG à partir du GSH. La présence de corps de Heinz, agglomérats d'hémoglobine dénaturée, en est souvent (mais non toujours) le témoin. Le GSH est un protecteur de la membrane cellulaire contre les peroxydes présents dans la cellule. Dans le cas de déficit en G6PD, la diminution du NADPH entraîne une diminution du GSH, ce qui entrave l'efficacité du système protecteur de la membrane érythrocytaire, provoquant ainsi l'hémolyse.

vate kinase est en bonne voie de résolution [13, 14]. Les déficits en pyruvate kinase connus jusqu'à présent proviennent de mutations de la pyruvate kinase R qui, pour la plupart, entraînent l'instabilité de l'enzyme. Ce type de déficit est facilement décelable chez les homozygotes. Mais chez les hétérozygotes composites, l'association d'une enzyme instable et d'une enzyme fonctionnellement déficiente peut donner lieu à des diagnostics erronés ne pouvant être corrigés qu'après étude des propriétés cinétiques de l'enzyme [6]. Récemment, quelques mutants ont été identifiés chez des malades homozygotes pour une pyruvate kinase instable résultant de mutations ponctuelles. Elles sont répertoriées dans une revue

générale récente [15]. La biologie moléculaire a montré que des sujets déficients présentant des caractères biologiques différents portaient souvent la même mutation. Certaines mutations, jusqu'ici considérées comme seulement responsables de pathologie érythrocytaire, peuvent aussi être causes de troubles dans d'autres tissus. Certains cas de déficit en phosphoglycérate kinase en sont des exemples. En effet, ce déficit assez rare, primitivement reconnu comme responsable d'une anémie hémolytique, compliquée ou non de signes d'atteinte neurologique [6], a été trouvé à l'origine d'un syndrome musculaire à type de myopathie métabolique, isolé [16] ou associé à une hémolyse [17]. Ces différentes expressions cli-

niques, qui existent également pour d'autres enzymopathies, sont probablement liées au type de la mutation. Une anomalie dans le métabolisme du glutathion peut aussi provoquer une hémolyse comme c'est le cas dans le déficit en G6PD et des enzymes du métabolisme du glutathion. Le mécanisme de cette hémolyse est totalement différent de celui qu'on a évoqué précédemment (figure 3). Une place à part doit être faite au déficit en glutathion synthétase, déficit certes rare, mais qui s'exprime par une anémie hémolytique, isolée ou accompagnée de signes d'acidose métabolique et parfois d'un dysfonctionnement neurologique avec retard mental [9]. Parmi ces enzymopathies, le déficit en G6PD [2, 18, 19] est de loin le plus répandu. Il affecte environ 400 millions de sujets dans le monde, avec une fréquence de 5 % à 25 % en Afrique subsaharienne, dans le Moyen-Orient, en Asie tropicale et subtropicale, et dans certaines zones du pourtour méditerranéen. Cette très forte fréquence a, comme pour les hémoglobinopathies, fait évoquer un avantage sélectif vis-à-vis de l'impaludation, et cela d'autant plus que la cartographie de l'incidence du déficit en G6PD coïncide avec celle de l'impaludation. Ce déficit, extrêmement étudié, entraîne des signes cliniques singuliers et divers. Souvent bien toléré, il se manifeste parfois par une anémie hémolytique chronique, mais il est surtout connu pour sa responsabilité dans des crises d'hémolyse aiguë, survenant à la suite de l'ingestion de certains médicaments ou produits oxydants tels que les antipaludéens, les sulfamides, le bleu de méthylène, etc., ou de certains aliments comme les fèves qui affectent particulièrement certains types de sujets déficitaires. Les mécanismes moléculaires exacts de ces accidents ne sont cependant pas parfaitement élucidés, et ce d'autant moins qu'il n'existe le plus souvent aucun test *in vitro* reproduisant le phénomène.

Le favisme ne se manifeste que dans un type de déficit en G6PD, tous les sujets ayant un déficit en G6PD ne sont pas sensibles aux fèves. Les hypothèses de l'intervention d'un facteur génétique autosomique ou

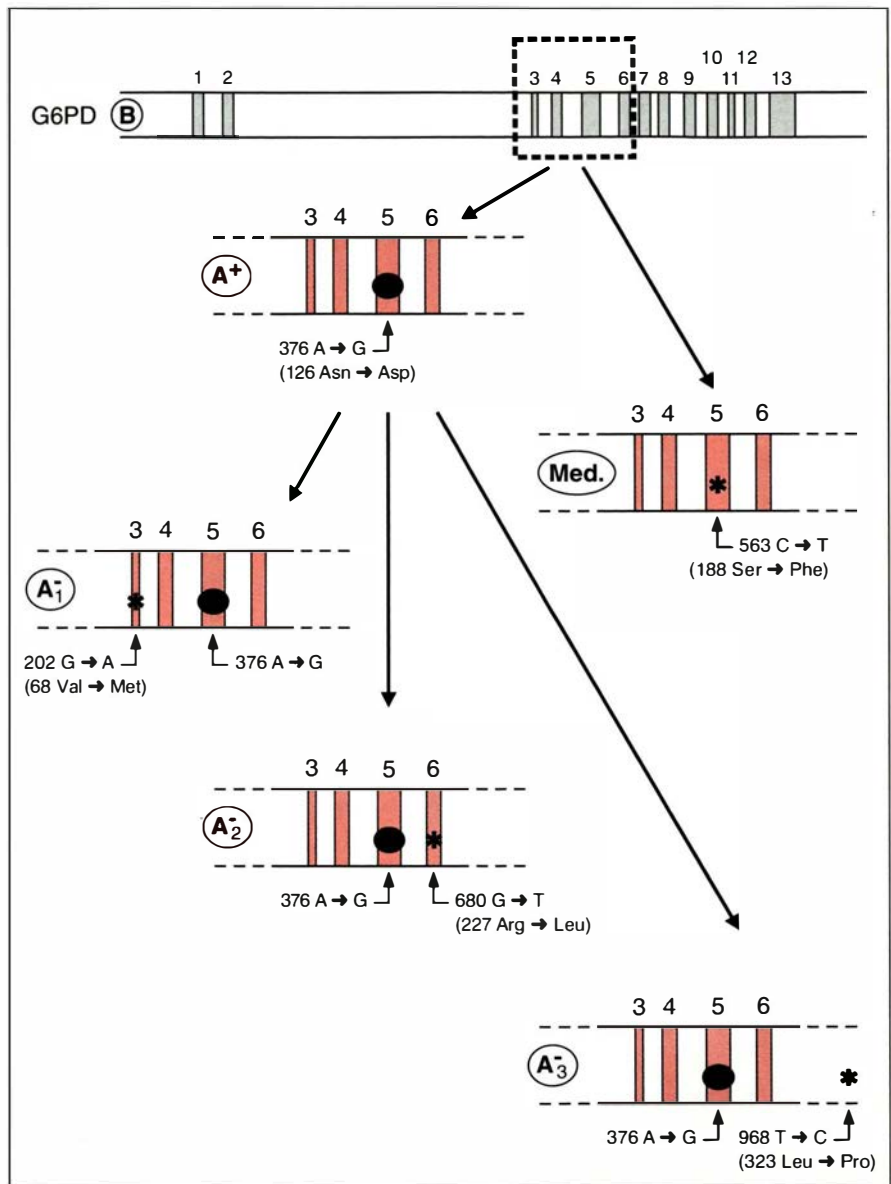


Figure 4. **Représentation schématique du gène de la G6PD.** Les numéros correspondent aux exons figurés en gris. En haut, la cartographie du gène de la G6PD-B considéré comme la référence, puis viennent les schémas agrandis de la partie du gène de G6PD contenant les exons de 3 à 6 avec la représentation de chaque mutation dans l'exon correspondant. Le gène A^+ ne se différencie du gène B que par une mutation 376 A \rightarrow G figurée par * et correspondant à 126 Asn \rightarrow Asp dans la protéine produite. Celle-ci a une activité enzymatique quasi équivalente à celle de B. Les mutations liées à des déficits sont représentées par un astérisque *. Le gène du déficit de type méditerranéen (Med.) a probablement dérivé du gène B par une substitution en 563. Chez les sujets déficitaires A^- , l'analyse de leurs gènes $A(-;1)$, $A(-;2)$, $A(-;3)$ a montré que tous trois portent deux mutations dont l'une (376 A \rightarrow G) est commune à celle du gène A^+ .

RÉFÉRENCES

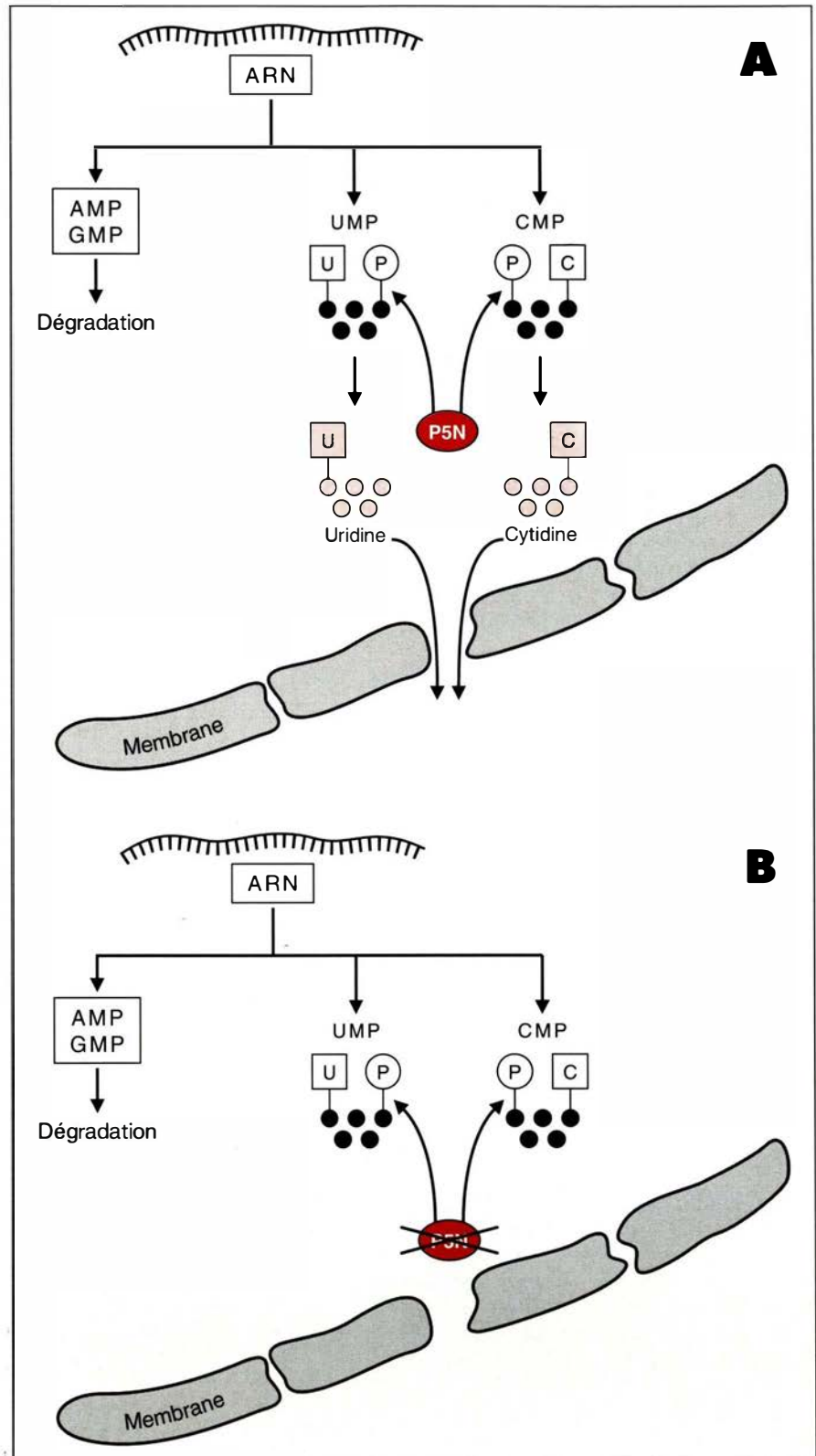
26. Rosa R, Préhu MO, Beuzard Y, Rosa J. The first case of a complete deficiency of diphosphoglycerate mutase in human erythrocytes. *J Clin Invest* 1978 ; 62 : 907-15.
27. Galactéros F, Rosa R, Préhu MO, Najean Y, Calvin MC. Déficit en diphosphoglycérate mutase: nouveaux cas associés à une polyglobulie. *Nouv Rev Fr Hematol* 1984 ; 26 : 69-74.
28. Chiba H, Sasaki R. Functions of 2,3-diphosphoglycerate and its metabolism. In : Horecker BL, Stadmann ER, eds. *Current topics in cellular regulation*, New York Inc. : Academic Press, 1978 : 75-116.
29. Rosa R, Blouquit Y, Calvin MC, Promé D, Promé JC, Rosa J. Isolation characterization and structure of a mutant 89 Arg AE Cys bisphosphoglycerate mutase: implication of the active site in the mutation. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 7837-43.
30. Lemarchandel V, Joulin V, Valentin C, et al. Compound heterozygosity in a complete erythrocyte bisphosphoglycerate mutase deficiency. *Blood* 1992 ; 80 : 2643-9.
31. Garel MC, Joulin V, Le Boulch P et al. Human bisphosphoglycerate mutase. Expression in *Escherichia coli* and use of site-directed mutagenesis in the evaluation of the role of the carboxyl terminal region in the enzymatic mechanism. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 18966-72.
32. Jaffé ER, Hultquist DE. Cytochrome b5 reductase deficiency and enzymopenic hereditary methemoglobinemia. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly VS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*, New York : Mc Graw-Hill, 6th edition, 1989 : 2267-80.
33. Mansouri A, Lurie AA. Concise review. Methemoglobinemia. *Am J Hematol* 1993 ; 42 : 7-13.
34. Dreyfus JC. Mécanismes moléculaires des enzymopathies génétiques. *médecine/sciences* 1989 ; 5 : 93-102.
35. Hirono A, Beutler E. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 3951-4.
- d'un facteur immunologique ont été successivement évoquées, mais aucune preuve n'est venue les étayer. L'effet toxique semble provenir de certains constituants des fèves, comme la divicine et l'isoumaril, mais le mécanisme de leur action n'est pas connu [18, 20]. La transmission génétique de la G6PD étant liée au chromosome X, cette enzyme a été utilisée pour l'étude du mécanisme de l'inactivation de ce chromosome [19]. Le polymorphisme de l'enzyme, chez le sujet non déficitaire (type B pour la plupart des sujets, type A2+ pour 30 % des malades d'origine africaine), a permis de mettre en évidence l'origine clonale de certaines tumeurs [18] et de l'utiliser comme marqueur génétique des populations. L'étude de la structure protéique de la G6PD a donné lieu à quelques controverses. Bien que l'enzyme fût connue et étudiée depuis longtemps, sa structure n'a été élucidée que tardivement [21, 22], probablement en raison de la taille assez importante de la protéine. De même la structure du gène a donné, et donne encore lieu, à bien des controverses [23]. L'introduction des techniques de biologie moléculaire a permis une « révolution culturelle » dans le monde compliqué des déficits en G6PD. Débroussaillage d'abord très laborieux car ayant exigé le clonage de l'ADNc de chaque mutant étudié au début, puis balayage rapide depuis l'utilisation de la PCR [23]. Les travaux de l'équipe de L. Luzato ont été décisifs. La traditionnelle classification des mutants de la G6PD, uniquement fondée sur les différences phénotypiques des très nombreux variants, a été bouleversée par l'analyse des mutations. Des notions importantes ont ainsi pu être dégagées. Comme pour les hémoglobinopathies, le même phénotype recouvrait des mutations différentes et, à l'inverse, nombre de mutants considérés comme différents étaient en fait identiques du point de vue génomique. Les différences entre G6PD à activité normale (type B, le plus répandu dans le monde ; type A, chez 30 % des Africains) et les types déficitaires les plus répandus (déficit A-, majoritaire chez les africains et déficit méditerranéen) ont été élucidées au niveau moléculaire (figure 4). Plus de quarante mutations ont été identifiées à l'heure actuelle, dispersées à peu près sur toute la longueur de l'ADNc. Une différence intéressante par rapport au modèle de référence « hémoglobinopathies » consiste en la quasi-absence de délétions ou de décalage, contrastant avec la fréquence d'accidents de ce type pour les gènes de globine. Absence d'appariement mitotique, différences de nature des séquences, ou létalité entraînée par ce type d'accidents et empêchant donc leur criblage ? Il est encore trop tôt pour trancher. Il est intéressant à ce propos, pour les jeunes générations converties à la biologie moléculaire, de noter les limites de celle-ci en matière de corrélations structure/fonction. Etablir celles-ci sans un modèle tridimensionnel de la protéine est une tâche impossible et, jusqu'à présent, seul un éventuel site de fixation du coenzyme NADP a pu être localisé à l'aide de mutants [24]. Cette absence de modèle empêche aussi de tirer profit d'éventuels mutants produits par mutagenèse dirigée. Beaucoup reste donc à faire dans le domaine de la G6PD et de ses déficits, y compris pour la compréhension du favisme.
- Les déficits en pyrimidine-5' nucléotidase (P5N), caractérisés par un défaut de dégradation de l'ARN, entraînent un excès d'ARN qui précipite sur la membrane et n'est pas fonctionnel. Ce déficit est caractérisé par la présence de ponctuations basophiles dans les hématies du sujet déficient. La figure 5 en démontre le mécanisme. Ces ponctuations sont identiques à celles qu'on trouve dans le saturnisme mais, dans ce cas, elles sont causées par l'inactivation directe de la P5N par le plomb [6]. Bien que le déficit héréditaire en P5N soit considéré comme troisième en fréquence parmi les érythroenzymopathies [12], son gène, à l'heure actuelle, n'a pas encore été cloné. Ici aussi les mécanismes moléculaires n'en sont pas établis.

Autres érythroenzymopathies

Si la plupart des érythroenzymopa-

thies sont productrices d'hémolyse, certaines d'entre elles sont à l'origine d'autres hémopathies. Une polyglobulie peut être secondaire à une baisse de la concentration du 2,3 diphosphoglycérate (2,3 DPG) qui induit une augmentation de l'affinité des globules rouges pour l'oxygène. Le mécanisme de cette polyglobulie est probablement similaire à celui décrit pour les hémoglobines hyperaffines. Deux types d'enzymopathies responsables de la baisse du 2,3 DPG ont été décrits : l'hyperactivité de la pyruvate kinase [25] et le déficit en diphosphoglycérate mutase (DPGM) [26, 27]. La transmission génétique de l'expression clinique est ici autosomique dominante (comme pour l'hyperactivité de l'adénosine désaminase) probablement parce que l'hyperactivité de la pyruvate kinase ou le déficit en DPGM sont déjà suffisamment marqués chez l'hétérozygote pour perturber le métabolisme, avec les conséquences pathologiques qui en découlent. De ces deux enzymopathies, qui semblent très rares, le déficit en DPGM est le mieux étudié. Cette enzyme est maintenant bien connue, tant sa fonction que sa structure. Dimère composé de chaînes identiques, elle possède trois fonctions impliquant le 2,3 DPG et catalysées dans le même site actif [28]. L'un des cas de déficit en DPGM est particulièrement intéressant puisque le propositus faisait

Figure 5. **Mécanisme de formation des granulations basophiles.** **A.** L'action de la pyrimidine 5'-nucléotidase (P5N) est de libérer le phosphate des nucléotides uridine monophosphate (UMP) et cytidine monophosphate (CMP), produisant des nucléosides (uridine et cytidine) qui franchissent la barrière membranaire de l'érythrocyte. **B.** Au cours du déficit en P5N ou lors de l'inhibition de l'enzyme par intoxication au plomb, l'UMP et le CMP non hydrolysés, ne pouvant passer à travers la membrane, s'accumulent dans l'érythrocyte, inhibant la dégradation de l'ARN dont les débris (partiellement dégradés) forment les granulations basophiles. La relation entre la présence de ces granulations et l'hémolyse n'a pas été prouvée.



partie d'une fratrie composée de quatre sujets déficitaires, dont le taux quasi absent de 2,3 DPG s'est montré compatible avec une santé normale. La cause du déficit a été résolue au niveau moléculaire. La DPGM avait deux mutations différentes, chacune portée par l'un des allèles. L'une des mutations entraîne le remplacement, par une cystéine, d'une arginine proche du site actif. Cette mutation permet la synthèse d'une enzyme sous forme inactive [29]. La deuxième mutation, portée par l'autre allèle, entraîne un décalage qui empêche la synthèse de l'enzyme (figure 6) [30]. Il y a donc synthèse de 50 % de DPGM inactive dans les érythrocytes de ces sujets déficitaires, ce qui correspond aux valeurs trouvées par des techniques immunologiques. La découverte de ce déficit a été à l'origine d'une étude du site actif de la DPGM. Par mutagenèse dirigée, on a pu démontrer l'importance de certains acides aminés pour le fonctionnement de l'enzyme et la possibilité de le modifier [31]. Ces travaux montrent que, grâce aux possibilités ouvertes par l'application des techniques de la biologie moléculaire, des études de corrélation structure/fonction peuvent se faire maintenant sur des enzymes du globule rouge.

Un autre type d'érythroenzymopathie est représenté par le déficit en méthémoglobine réductase ou cytochrome B5 réductase détaillé dans deux revues générales récentes [32, 33].

Traitement

Le traitement de toutes ces enzymopathies héréditaires était jusqu'à présent uniquement symptomatique, palliatif de l'anémie hémolytique, préventif des crises d'hémolyse aiguë; les polyglobulies étaient traitées par saignée, les méthémoglobinémies par le bleu de méthylène et l'acide ascorbique. Un traitement préventif dans le cadre du diagnostic prénatal a pu être institué dans certains cas, mais la plupart de ces enzymopathies se traduisent par des signes cliniques de sévérité modérée, peu justiciables de ce type de prévention. Les avancées de la généti-

que moléculaire, tant du point de vue technique que théorique, permettront peut-être dans le futur de traiter la cause de ces enzymopathies. En effet, actuellement la majorité des gènes des enzymes érythrocytaires ont été séquencés [12]. Certaines des mutations responsables d'érythroenzymopathies sont identifiées (Tableau II). Les progrès apportés par la biologie moléculaire permettent d'espérer que la thérapie génique pourra être envisagée dans certaines formes graves, en tenant compte des problèmes éthiques et

théoriques déjà signalés par d'autres auteurs [34].

Conclusion

Les enzymopathies érythrocytaires ont constitué un splendide terrain d'application pour le savoir-faire des enzymologistes des années 1950 qui récoltaient le fruit des travaux des grands biochimistes de la glycolyse, des progrès de l'industrie chimique fournissant les substrats nécessaires aux études enzymatiques, et surtout de l'apparition de spectrophotomè-

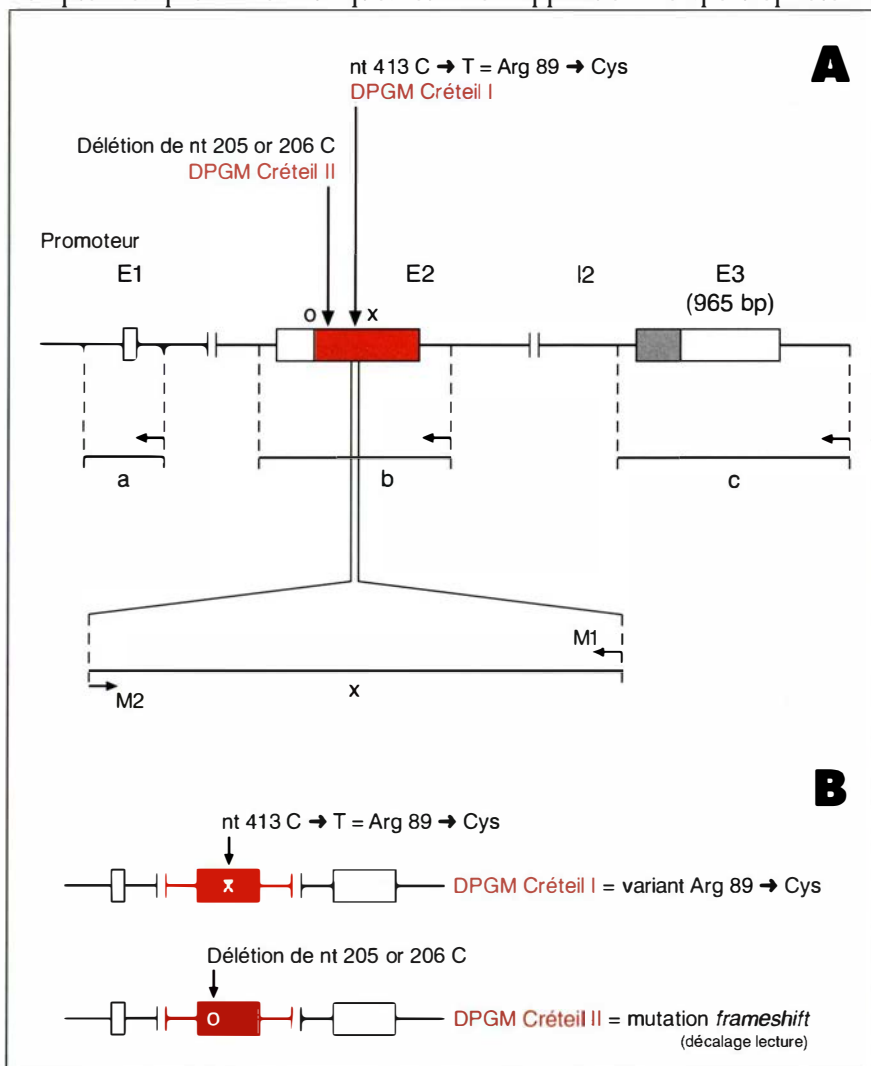


Figure 6. **Stratégie suivie pour l'analyse du gène de la DPGM chez un sujet déficitaire hétérozygote composite** [30]. **A**. Amplification du gène en trois parties (a, b, c), chacune contenant un exon, la jonction intron-exon et les régions flanquantes incluant le promoteur en 5' et la région adjacente en 3'. Pour l'analyse autour de la mutation correspondant au résidu Arg 89 et localisée dans l'exon 2, deux oligonucléotides M1 et M2 ont été utilisés. **B**. Génotype du malade déficitaire en DPGM : DPGM Créteil I, substitution C/T (Arg 89 / Cys); DPGM Créteil II, délétion de C205 ou 206 → décalage du cadre de lecture.

tres facilement utilisables. Ces travaux permirent d'identifier les causes de nombreuses anémies hémolytiques génétiquement déterminées, ainsi que celles des méthémoglobiniémies et de quelques variétés de polyglobulies. Les progrès furent ensuite très fortement ralentis par les difficultés de l'analyse moléculaire inhérentes à la faible quantité de protéines exprimées pour la plupart de ces enzymes. Les recherches concernant les enzymopathies n'avançaient plus, comparées à celles qui concernaient les hémoglobi-nopathies. Les possibilités offertes par la biologie moléculaire ont complètement débloqué la situation, ce qui permet d'aborder maintenant toute une série de problèmes restés en suspens. En ce qui concerne les déficits en G6PD, bien que l'identification des mutations au niveau moléculaire ait largement avancé, on n'a toujours pas la clé du redoutable favisme qui leur est parfois associé. Bien plus, on ignore par quels mécanismes certains médicaments déclenchent des accidents aigus, ce qui est d'autant plus gênant que la pharmacopée moderne met sans arrêt de nouveaux produits sur le marché.

Les corrélations structure/fonction, maintenant possibles, permettront peut-être de prévoir le degré de gravité de telle ou telle mutation et d'aider au conseil génétique. Ce problème se pose de façon épisodique pour certaines mutations très rares, mais constitue un réel problème pour les pédiatres en ce qui concerne les mutations de la triose-phosphate isomérase. Il n'est pas jusqu'aux déficits en pyruvate kinase qui ne posent problème dans les familles où des déficits entraînent des anémies extrêmement sévères et pour lesquels le diagnostic prénatal commence à être demandé. Enfin, il est possible, avec les progrès réalisés dans l'isolement des précurseurs érythropoïétiques, qu'apparaisse dans un futur proche une nouvelle catégorie d'enzymopathies, jusque-là indétectables, atteignant ces précurseurs. Beaucoup de travail reste donc à prévoir à nouveau dans ce domaine ! Mais qui le fera alors que les jeunes générations attirées par l'éclat de la pratique de la biologie moléculaire ignorent pour la plupart la pratique de l'enzymologie protéique, indispensable pour le développement de tels travaux ? ■

Summary

Erythroenzymopathies: a model of coordinated biochemistry and molecular biology

Since the discovery of glucose 6-phosphate dehydrogenase and pyruvate kinase deficiencies, many other erythrocyte enzymes abnormalities have been found. Most enzyme deficiencies from the Embden-Meyerhof pathway, pentose-phosphate pathway and nucleotide metabolism result in hemolytic anemias which can also be a consequence of adenosine deaminase hyperactivity. Hemolysis is considered to result from either low ATP level or NADPH insufficient production. On the other hand, a marked decrease of 2,3-diphosphoglycerate, by increasing the O₂-affinity of the red cells, induces polycythemia. Polycythemia can also result from diphosphoglycerate mutase deficiency and pyruvate kinase hyperactivity. In most erythroenzymopathies the genetic transmission is recessive autosomal (sometimes dominant such as in adenosine deaminase and pyruvate kinase hyperactivities and diphosphoglycerate mutase deficiency). Glucose 6-phosphate dehydrogenase and phosphoglycerate kinase deficiencies are X-chromosome linked. For many years the diagnosis of these enzymatic abnormalities has relied upon enzymatic assays because of the very low quantity of materials. The techniques of molecular biology can now be used and presently most of the red cell enzymes have been cloned. In addition, genetic mutations are continuously reported and prenatal diagnosis can be proposed in some cases.

Remerciements

L'auteur remercie Jean Rosa pour le concours actif qu'il a apporté à la rédaction de cet article.

Tableau II

GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DES ENZYMOPATHIES ÉRYTHROCYTAIRES

Enzymes	Localisation chromosomique	Mutations identifiées
hexokinase	10	-
glucose-phosphate isomérase	19	-
phosphofructokinase M	1	-
aldolase A	16	+
glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	12	-
triosephosphate isomérase	12	+
diphosphoglycérate mutase	7	+
phosphoglycérate kinase	X	+
énolase	-	-
pyruvate kinase R: déficit	1	+
glucose 6-phosphate déshydrogénase	X	+
enzyme glutathion	-	-
adénylate kinase	9	+
adénosine désaminase (hyperactivité)	20	-
pyrimidine-5' nucléotidase	-	-
cytochrome b5 réductase	22	+