

"CODE PK", vers un registre national des patients déficitaires en pyruvate kinase intraérythrocytaire. À propos des 60 premiers patients inclus

Olivier Lacrampre

▶ **To cite this version:**

Olivier Lacrampre. "CODE PK", vers un registre national des patients déficitaires en pyruvate kinase intraérythrocytaire. À propos des 60 premiers patients inclus. Médecine humaine et pathologie. 2013. dumas-00968198

HAL Id: dumas-00968198

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00968198

Submitted on 31 Mar 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BORDEAUX 2

U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2013 **N° 3136**

THESE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT DE

DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement
Vendredi 20 décembre 2013 à BORDEAUX

par

M. Olivier LACRAMPE

né le 23 juin 1986 à Mont-de-Marsan

« CODE PK », VERS UN REGISTRE NATIONAL DES PATIENTS DEFICITAIRES EN PYRUVATE KINASE INTRAERYTHROCYTAIRE. A PROPOS DES 60 PREMIERS PATIENTS INCLUS.

Directeur :

Mlle le Dr Marguerite MICHEAU

Membres du Jury :

M. le Pr François-Xavier MAHON, PU-PH……..……Président,
M. le Dr Serge PISSARD, MCU-PH……..……Rapporteur,
M. le Pr François MOREAU-GAUDRY, PU-PH……. Membre,
M. le Pr Yves PEREL, PU-PH……...……...Membre,
Mme le Dr Vanessa AUGIS, AHU……Membre,
Mlle le Dr Marguerite MICHEAU, Praticien attaché……... Membre.

Au Président du jury,

M. le Pr François-Xavier MAHON,

Professeur des Universités, Université de Bordeaux,
Praticien Hospitalier,
Chef de service du Laboratoire d'Hématologie du CHU de Bordeaux,

Vous me faites le grand honneur de présider le jury de cette thèse. Je vous remercie de votre disponibilité à mon égard ces derniers mois, et de votre appui constant, tant pour la réalisation de ce travail, que pour le bon déroulement de mon internat. Les douze mois passés au laboratoire d'hématologie des centres hospitaliers Pellegrin puis Haut-Lévêque, dont vous êtes Chef de Service, furent extrêmement enrichissants, passionnants, et formateurs.
Trouvez ici l'expression de mon profond respect.

Aux Membres du jury,

M. le Dr Serge PISSARD,

Maître de conférence des Universités, Université de Paris-Est-Créteil
Praticien Hospitalier, CHU Henri Mondor, Créteil,

Votre venue à Bordeaux en ce jour est le témoignage de votre grande implication dans ce travail, de votre accessibilité et de votre disponibilité à mon égard. Je vous remercie de votre soutien constant, de votre accueil au CHU Henri MONDOR, et de m'avoir permis de participer au Congrès de *l'European Red Cell Society* (ERCS) en Hollande le 11 octobre 2013 pour présenter ces travaux.
Soyez convaincu de ma reconnaissance,

M. le Pr François MOREAU-GAUDRY,

Professeur des Universités, Université de Bordeaux,
Praticien Hospitalier, CHU de Bordeaux,

Vous avez consenti à juger cette thèse après m'avoir accueilli au laboratoire de biochimie pendant six mois.
Recevez ici mes remerciements et mon amitié,

M. le Pr Yves PEREL,

Professeur des Universités, Université de Bordeaux,
Praticien Hospitalier,
Chef de Service d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique, CHU de Bordeaux,

Vous avez immédiatement accepté de juger ce travail. Je suis très honoré de vous compter parmi les membres de ce jury.
Soyez convaincu de ma sincère considération,

Mme le Dr Vanessa AUGIS,

Assistante Hospitalo-Universitaire,
CHU de Bordeaux et Université de Bordeaux,

Je suis très heureux et très honoré de ta présence au sein de ce jury. Tu as su me transmettre tes connaissances avec efficacité et patience. Ton travail rigoureux au laboratoire, mais aussi ta présence rassurante, sont une chance donnée aux internes lors de leur passage au laboratoire d'hématologie.
Reçois ici la marque de ma reconnaissance et de mon amitié,

Mlle le Dr Marguerite MICHEAU,

Praticien attaché, CHU de Bordeaux,

Vous êtes un modèle pour nous tous. Votre dévouement auprès des patients, des internes, des membres de la communauté hospitalière, inspire l'admiration.
Vous m'avez proposé ce travail et m'avez apporté conseils, appui et soutien au cours de ces dix-neufs mois. Je vous remercie d'être, à chaque instant, restée disponible malgré vos multiples activités hospitalières et extra-hospitalières.
Grâce à vous, j'ai pu rencontrer et examiner, une grande partie des patients bordelais déficitaires en pyruvate kinase, lors de vos consultations ou de leurs séjours hospitaliers. Cette plus-value clinique a été indispensable et je vous en suis reconnaissant.
Je vous suis gré de m'avoir permis de présenter nos travaux au Congrès des Centres de Référence et Centres de Compétence des Maladies Constitutionnelles du Globule Rouge et de l'Erythropoïèse, à Paris le 31 mai 2013.
Maguy, recevez ma profonde admiration et toute mon amitié.

A Mme le Dr Isabelle THURET,

Praticien hospitalier, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille,
Responsable du Centre National de Référence sur les Thalassémies,
qui, par son expérience de la constitution du Registre national des patients atteints de thalassémie, son implication dans notre groupe de travail, ses conseils avisés, ses relectures attentives de l'ensemble de nos travaux, son dynamisme, a très largement contribué à la conduite et aux conclusions de notre étude.

Aux contributeurs de cette étude,

Dr BARRY M. (CH de Boulogne sur Mer)

Dr BOURLET A. (Hôpital Saint-Vincent de Paul, Lille)

Dr CASTEX MP. (CHU de Toulouse)

Dr COUILLAULT G. (CHU de Dijon)

Dr ESPINOUSE D. (CHU de Lyon-Sud)

Pr GALACTEROS F. (CHU H. MONDOR, Créteil)

Dr GUITTON C. (CHU de Bicêtre)

Dr LAHARY A. (CHU de Rouen)

Dr LAMBILLIOTE A. (CHRU de Lille)

Dr MAAKAROUN A. (CH de Bourges)

Pr MAHON FX. (CHU de Bordeaux et Institut F. BERGONIE)

Dr MICHEAU M. (CHU de Bordeaux)

Dr MONPOUX F. (CHU de Nice)

Dr MUNZER M. (CHU de Reims)

Dr NAVARRO R. (CHU de Montpellier)

Dr PONDARRE C. (CHU de Lyon-Sud)

Pr ROSE C. (Hôpital St Vincent de Paul, GHICL, Lille)

Pr SALLES G. (CHU Lyon-Sud)

Dr SWIADER L. (CHU de la Timone, AP-HM, Marseille)

Dr THURET I (CHU de la Timone, AP-HM, Marseille)

Dr WIRTH J. (CHU Tenon, AP-HP, Paris)

Aux personnels de l'Unité des Maladies Génétiques du Globule Rouge du CHU Henri MONDOR, (Créteil), qui ont contribué à établir les génotypes des patients déficitaires.

A Aurore,

A mes Parents,

A ma grand–mère, et à l'ensemble de ma famille,

A Chantal, Patrick et Alexandre, à ma belle-famille,

A Wanda et Laure,

A Antoine, Maylis, Stanislas, Cathy, Hubert, Jean, Anne-Sophie, Alix, Laure et Arnaud,

A Anne, Marie, Bastien, David, Tanguy et Yohann,

A l'ensemble de mes collègues internes, et anciens internes,

Au Dr Stéphanie DULUCQ,

Aux personnels du Laboratoire du CHU de Bordeaux,

Aux Drs Katell ANDRE, Laurence CAUNEGRE et Guillemette FREMONT, à Cathy DAMESTOY, et à l'ensemble de l'équipe de médecine infectieuse du CH de Dax.

A Anita, Antoine et Fernand.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations 11

Liste des figures 13

Liste des tableaux 15

INTRODUCTION 16

PARTIE 1 : Déficit en pyruvate kinase intraérythrocytaire, notions fondamentales 18

1.1. Métabolisme énergétique du globule rouge 18

1.1.1. Production et consommation d'énergie par le globule rouge 19
1.1.2. Voie métabolique principale d'Embden-Meyerhof 20
1.1.3. Voies métaboliques en dérivation 22
1.1.3.1. Le shunt des pentoses phosphate (ou des hexoses monophosphate) 22
1.1.3.2. Le cycle du 2,3-diphosphoglycérate de Rapoport et Luebering 23
1.1.4. Régulation de la glycolyse intraérythrocytaire, étapes limitantes 25

1.2. Pyruvate kinase : enzyme-clef de la glycolyse intraérythrocytaire 26

1.2.1. Généralités 26
1.2.2. Etape catalysée 26
1.2.3. Isoenzymes isolées chez l'Homme 27
1.2.3.1. PK-R et PK-L 27
1.2.3.2. PK-M1 et PK-M2 28
1.2.4. Structure de la PK-R humaine 29
1.2.5. Régulation physiologique de l'activité de la PK 32

1.3. Déficit en pyruvate kinase intraerythrocytaire : épidemiologie, physiopathologie, diagnostic. 36

1.3.1. Epidémiologie 37
1.3.1.1. Prévalence 37
1.3.1.2. Place du déficit en PK par rapport aux autres enzymopathies érythrocytaires à l'origine d'hémolyse chronique congénitale non-sphérocytaire 37
1.3.2. Du déficit en pyruvate kinase à l'hémolyse chronique 40
1.3.2.1. Physiopathologie 40
1.3.2.1.1. Déformabilité du globule rouge dans des conditions physiologiques 40
1.3.2.1.2. Altération de la déformabilité érythrocytaire chez le patient déficitaire en PK 41
1.3.2.1.3. Déficit en PK et érythropoïèse 42
1.3.2.2. Présentation biologique et clinique 42
1.3.2.2.1. Historique 42
1.3.2.2.2. Premières descriptions cliniques 43
1.3.2.2.3. Tableaux cliniques et biologiques 46
1.3.2.2.4. Démarche diagnostique 47
1.3.2.2.4.1. En période néonatale et chez le nourrisson 47
1.3.2.2.4.2. Chez l'enfant et l'adulte 50
1.3.3. Examens de biologie spécialisée 52
1.3.3.1. Mesure de l'activité enzymatique de la PK 52
1.3.3.1.1. Problématique principale et limite de la méthode 52
1.3.3.1.2. Principe de la méthode 55
1.3.3.1.2.1. Prélèvement et conservation de l'échantillon 55
1.3.3.1.2.2. Pré-traitement de l'échantillon : préparation d'un hémolysat 56
1.3.3.1.2.3. Phase analytique : dosage de l'activité 57
1.3.3.1.2.4. Phase post-analytique : interprétation des résultats 58
1.3.3.1.3. Situations particulières 59
1.3.4. Etude génotypique de *PKLR* 60
1.3.4.1. A propos de PKLR 60
1.3.4.2. Mutations de PKLR 61

PARTIE 2 : Présentation de trois observations détaillées de patients déficitaires en PK 64

2.1. Observation n°1 : patient Bd09 65

2.2. Observation n°2 : patient Bd04 68

2.3. Observation n°3 : sœurs Bd10 et Bd11 73

PARTIE 3 : « CODE PK », présentation des résultats de l'étude de 60 patients deficitaires en pyruvate kinase intraérythrocytaire 76

3.1. « CODE PK » : présentation de l'étude et de sa méthodologie 76
3.1.1. Initiative et objectifs 76
3.1.2. Méthodologie 77
3.1.3. – Aspects réglementaires 78

3.2 – CODE PK : présentation des résultats 79
3.2.1. Démographie de la cohorte 79
3.2.2. Présentation des groupes de sévérité phénotypique 82
3.2.3. Présentations cliniques 83
3.2.3.1. Âge au diagnostic 83
3.2.3.2. Circonstances cliniques 84
3.2.3.2.1. Période périnatale et néonatale 85
3.2.3.2.2. Diagnostic après la période néonatale 86
3.2.4. Bilan biologique de base lors du diagnostic 87
3.2.4.1. Taux d'hémoglobine 87
3.2.4.2. Réticulocytes 87
3.2.4.3. Bilan biochimique 89
3.2.4.3.1. Bilirubinémie 89
3.2.4.3.2. Autres marqueurs biochimiques d'hémolyse 89
3.2.4.4. Biologie au diagnostic et sévérité du phénotype actuel 89
3.2.5. Activités enzymatiques 90
3.2.6. Génotypage 99
3.2.7. Prise en charge 105
3.2.7.1. Transfusions 105
3.2.7.2. Splénectomie 107
3.2.8. Complications 108
3.2.8.1. Lithiases biliaires 108
3.2.8.2. Surcharge martiale 109
3.2.8.2.1. Patients n'ayant jamais bénéficié de transfusion 109
3.2.8.2.2. Patients transfusés 111
3.2.8.2.3. Sévérité et surcharge martiale 111
3.2.8.3. Autres complications 118

PARTIE 4 : Discussion, limites, perspectives 119

4.1. Diversité de la présentation clinico-biologique du déficit en PK et stratégies de prise en charge 119
4.1.1. Une pathologie ubiquitaire sous-diagnostiquée 119
4.1.2. Présentations cliniques 120
4.1.3. Variation des paramètres biologiques 121
4.1.4. Situations de décompensation 123
4.1.4.1. Infection virale à Parvosvirus B19 123
4.1.4.2. Grossesse et déficit en PK 123
4.1.5. Mort fœtale in utero et décès consécutifs au déficit 124
4.1.6. Manifestations hépatiques 126
4.1.7. Surcharge martiale 127
4.1.7.1. Physiopathologie 127
4.1.7.2. Suivi et stratégies de prise en charge 128

4.2. Génotypes et sévérité clinique 130
4.2.1. Types de mutations en fonction de la sévérité 130
4.2.2. p.Arg510Gln 134
4.2.3. p.Arg486Trp 137
4.2.3. Autres mutations récurrentes 139
4.2.3.1. p.Asn393Ser 139
4.2.3.2. p.Arg479His 140
4.2.3.3. p.Glu241stop 140

4.3. Prise en charge des patients déficitaires en PK 140
4.3.1. Prise en charge classique 140
4.3.2. Allogreffe de moelle osseuse 141
4.3.3. Thérapie génique 142

4.4. Limites et perspectives 143
4.4.1. Limites 144
4.4.2. Perspectives 144

CONCLUSION 146

ANNEXES 148

Annexe 1 – Phylogénèse de la pyruvate kinase 148
Annexe 2 – Mutations de *PKLR* déjà décrites 150
Annexe 3 – Fiche d'inclusion dans sa version la plus récente (mars 2013) 157

BIBLIOGRAPHIE 161

SERMENT D'HIPPOCRATE 171

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Di-Phosphate
AH(AI)	Anémie hémolytique (auto-immune)
AK	Adénylate kinase
AMP	Adénosine monophosphate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
CCTIRS	Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche sur la Santé
CDC	Centers for Disease Control
CER	Comité d'Evaluation des Registres
CNIL	Comission Nationale de l'Informatique et des Libertés
CNR	Centre national de référence
CST	Coefficient de saturation de la transferrine
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
BPG	Bisphosphoglycérate
EPH	Electrophorèse de l'hémoglobine
EMA	Eosine-5'-maléimide
ENERCA	European Network for Rare and Congenital Anaemias
F1,6BP	Fructose-1,6-bisphosphate
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
G6PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GDF	Growth Differentiation Factor
GPI	Glucose Phosphate Isomérase
HAS	Haute Autorité de Santé
Hb	Hémoglobine
HK	Hexokinase
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPN	Hémoglobinurie paroxystique nocturne
INCa	Institut National du Cancer
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale
INVS	Institut National de Veille Sanitaire
IRM	Imagerie par Résonnance Magnétique
LDH	Lactate déshydrogénase
MAT	Microangiopathie thrombotique
MCGRE	Maladies constitutionnelles du globule rouge et de l'érythropoïèse
NAD/NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP/NADPH	Nicotinamidenicotinamide-dinucléotide phosphate
P5N	Pyrimidine-5'-nucleotidase
PCR	Polymerase Chain Reaction

PEP	Phosphénolpyruvate
PFK	Phosphofructokinase
PGK	Phosphoglycérate kinase
PK	Pyruvate kinase
PPDK	Pyruvate phosphate dikinase
SHU	Syndrome hémolytique et urémique
TDA	Test Direct à l'Antiglobuline
TPI	Triose phosphate isomérase

Liste des figures

1. Les étapes successives de la voie d'Embden-Meyerhof
2. Shunt des hexoses et pentoses phosphate
3. Cycle du 2,3-BPG
4. Effet d'une accumulation de 2,3-BPG sur la courbe de dissociation de l'oxygène
5. Isoenzymes de PK exprimées au cours de l'hématopoïèse
6. Représentation tridimensionnelle d'un monomère de pyruvate kinase intraérythrocytaire
7. Structure tridimensionnelle tétramérique de la PK-R
8. Transition conformationnelle de la pyruvate kinase
9. Effet du fructose-1,6-biphosphate sur l'activité de la pyruvate kinase
10. Place du déficit en PK par rapport aux autres enzymopathies érythrocytaires à l'origine d'hémolyses chroniques non sphérocytaires
11. Arbre généalogique de la communauté Amish de Mifflin County
12. Démarche diagnostique devant une anémie hémolytique du nouveau-né/nourrisson
13. Démarche diagnostique devant une anémie hémolytique chez l'adulte
14. Impact de l'âge médian des hématies sur la mesure d'activité de la PK
15. Nature des 223 mutations de *PKLR* actuellement recensées
16. Topographie des mutations de *PKLR*
17. Séquence protéique de PK-R
18. Frottis de moelle osseuse du patient Bd09 au microscope optique
19. Arbre généalogique de Bd04
20. Evolution de la surcharge martiale de Bd04 sous chélation médicamenteuse par Exjade depuis 2009
21. Arbre généalogique de la Famille R.
22. Répartition des patients par tranche d'âge
23. Âge au diagnostic
24. Âge au diagnostic et sévérité en fonction de la sévérité phénotypique
25. Prévalence de la splénomégalie au sein de chaque groupe de sévérité phénotypique
26. Fréquence respective des signes cliniques observés lors d'un diagnostic entre J0 et J30 de vie
27. Taux d'hémoglobine initial en fonction de l'âge au diagnostic
28. Réticulocytes en fonction de l'âge au diagnostic (moyennes)
29. Activités enzymatiques de pyruvate kinase intraérythrocytaire chez les homozygotes et hétérozygotes composites pour des mutations de *PKLR* versus les hétérozygotes

30. Ratio d’activités enzymatiques PK/HK en fonction de la sévérité du phénotype
31. Besoins transfusionnels
32. Incidence des manifestations lithiasiques hépatobiliaires en fonction de la sévérité phénotypique
33. Ferritinémie moyenne en fonction de la sévérité du phénotype
34. Paramètres biologiques de 61 patients déficitaires en PK de la cohorte italienne
35. Mécanisme de régulation par l’hepcidine, de l’expression membranaire de la ferroportine
36. Types de mutations en fonction de la sévérité du phénotype
37. Répartition géographique des principaux variants en Europe
38. Phénotypes associés à une mutation p.Arg510Gln
39. Comparaison des propriétés du mutant p.Arg510Gln et de la PK sauvage
40. Comparaison des thermostabilités de la PK sauvage et du mutant p.Arg510Gln
41. Phénotypes associés à une mutation p.Arg486Trp
42. Propriétés fonctionnelles de p.Arg486Trp in vitro
43. Représentation tridimensionnelle de l’impact de la mutation p.Arg486Trp
44. Gène hybride construit par Kanno et al.

Liste des tableaux

1. Classification des anémies hémolytiques
2. Présentation des sept cas rapportés par Tanaka en 1962
3. Eléments orientant vers une hémolyse intravasculaire ou intratissulaire
4. Stabilité des enzymes en fonction du milieu de stockage et de la température
5. Polymorphismes du gène *PKLR*
6. Activités enzymatiques mesurées pour Bd04
7. Activités enzymatiques mesurées pour la famille de Bd04
8. Activités enzymatiques mesurées pour Bd10 et sa famille
9. Centres d'inclusion de l'étude CODE PK
10. Origine géographique des parents des 60 patients inclus
11. Composition de chacun des groupes de sévérité
12. Biologie au diagnostic en fonction de la sévérité
13. Paramètres biologiques au diagnostic et présentation clinique lors d'un diagnostic entre la naissance et le 30ème jour de vie
14. Paramètres biologiques au diagnostic et présentation clinique lors d'un diagnostic entre le 1er mois de vie et l'âge de 2 ans
15. Paramètres biologiques au diagnostic et présentation clinique au delà de 2 ans
16. Génotypes des 60 patients inclus
17. Evolution du taux d'hémoglobine avant et après splénectomie
18. Estimation de la surcharge martiale chez les patients non-transfusés et non-chélatés et non-saignés
19. Estimation et prise en charge de la surcharge martiale chez les patients ayant bénéficié de une à dix séances transfusionnelles
20. Estimation et prise en charge de la surcharge martiale chez les patients ayant bénéficié de onze à vingt séances transfusionnelles
21. Estimation et prise en charge de la surcharge martiale chez les patients ayant bénéficié de vingt-et-une à cent séances transfusionnelles
22. Estimation et prise en charge de la surcharge martiale chez les patients ayant bénéficié de plus de cent séances transfusionnelles
23. Estimation et prise en charge de la surcharge martiale chez les patients ayant bénéficié d'un nombre de séances transfusionnelles non-précisé
24. Présentation de trois cas avec décès d'un nourrisson déficitaire en PK
25. Présentation comparative des molécules disponibles pour la chélation martiale

INTRODUCTION

Les enzymopathies érythrocytaires sont connues depuis 1956, année de mise en évidence du déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) par Carson et al.. Plusieurs autres enzymopathies érythrocytaires ont été objectivées depuis, et parmi elles, le déficit en pyruvate kinase (PK) intraérythrocytaire, décrit en 1961 par Valentine et al.. Cependant ces deux pathologies diffèrent sur le plan de physiopathologie de l'hémolyse induite, mais également sur la présentation clinique et l'évolution à long terme.

Chez le patient déficitaire en G6PD, l'altération du potentiel réducteur de l'hématie entraine des crises d'hémolyse aiguë, lors d'un stress oxydatif. Le déficit en PK induit, au contraire, une hémolyse évoluant sur un mode chronique. En effet, le mécanisme de la diminution de la durée de vie de l'hématie est consécutive à une altération permanente de la production énergétique intraérythrocytaire.

Ainsi, si le déficit en PK est, loin après le déficit en G6PD, la seconde enzymopathie érythrocytaire la plus fréquente, il est surtout la première cause d'anémie hémolytique congénitale non-sphérocytaire d'évolution chronique.

Cette pathologie, rare et ubiquitaire, est caractérisée par une expression clinique et biologique très variable allant de formes létales du nourrisson à des présentations peu symptomatiques chez l'adulte. Plus de 600 cas ont été rapportés à travers le Monde et environ 220 mutations du gène *PKLR*, codant pour la PK intraérythrocytaire ont été décrites à ce jour.

Nous proposons ici, d'exposer dans un premier temps la physiopathologie du déficit en PK intraérythrocytaire, les principaux arguments cliniques et biologiques, ainsi que les examens paracliniques permettant de confirmer le diagnostic.

Nous présenterons dans un second chapitre, trois observations détaillées de patients déficitaires en PK.

Nous exposerons dans un troisième temps, les premiers résultats de l'étude oligocentrique de 60 patients déficitaires en PK intraérythrocytaire, tous génotypés, et présentant des mutations du gène *PKLR* à l'état homozygote ou hétérozygote composite.

Nous engagerons finalement une discussion portant sur certains points d'intérêt, dont la présentation phénotypique du déficit, et les situations atypiques. Nous détaillerons les caractéristiques des principales mutations retrouvées dans la population étudiée. Nous discuterons également la problématique de la surcharge martiale et les stratégies thérapeutiques, avant d'exposer les limites et les perspectives de ce travail.

PARTIE 1 : Déficit en pyruvate kinase intraérythrocytaire, notions fondamentales

La fonction première de l'hématie est le transport d'oxygène vers les tissus. Pendant les 120 jours au cours desquels elle circule dans le sang, elle est soumise à des contraintes rhéologiques et métaboliques. L'équipement enzymatique dont elle dispose lui permet de maintenir l'intégrité de la membrane et du contenu érythrocytaire. Cependant, l'épuisement progressif de ces enzymes aboutit à une sénescence physiologique du globule rouge.

Les pathologies altérant l'activité des enzymes érythrocytaires aboutissent à une sénescence anticipée de l'hématie (1). Le déficit en PK intraérythrocytaire implique un déficit énergétique au sein du globule rouge impactant son métabolisme à divers niveaux.

1.1. Métabolisme énergétique du globule rouge

L'érythrocyte étant dépourvu de système mitochondrial (et donc incapable d'engager un cycle de Krebs), sa survie ne dépend donc que d'un équipement enzymatique non-renouvelable. Ces enzymes lui permettent de produire de l'énergie via la glycolyse anaérobie, dite voie d'Embden-Meyerhof. Cette voie métabolique, qui comporte 10 étapes catalytiques, fournit sous forme d'ATP, l'énergie nécessaire au maintien de la forme biconcave de l'hématie et aux activités de transport ionique de sa membrane.

La voie d'Emden-Meyerhof est également à l'origine de phosphates organiques, indispensables à la régulation de la fonction oxyphorique. Le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-BPG), modulateur physiologique du transport de l'oxygène par l'hémoglobine, est ainsi synthétisé dans une dérivation de la voie d'Embden-Meyerhof appelée shunt de Rapoport-Luebering.

1.1.1. Production et consommation d'énergie par le globule rouge

Le gain net d'ATP est de deux moles pour une mole de glucose engagée dans la voie de la glycolyse. Au sein du globule rouge mature, l'ATP assure :

- Une fonction de substrat :
    - Maintien de l'équilibre osmotique, nécessaire à sa propre intégrité par le biais de pompes Na/K ATP-ases
    - Phosphorylation du glucose et du fructose-6-phosphate au cours de la glycolyse anaérobie
    - Synthèse des purines et pyrimidines nucléotidiques

- Une fonction d'effecteur allostérique :
    - Régulation négative de la glycolyse en excès d'ATP par inhibition de la pyruvate kinase et de la phosphofructokinase

Afin de mieux comprendre l'impact d'un déficit en pyruvate kinase intraérythrocytaire, nous exposons dans un premier temps les grandes voies métaboliques fournissant de l'énergie au sein du globule rouge.

La composante principale est la voie d'Embden-Meyerhof sur laquelle se branchent deux voies en dérivation.

1.1.2. Voie métabolique principale d'Embden-Meyerhof (2)

Cette voie métabolique majeure produit une grande partie de l'ATP nécessaire au fonctionnement de l'hématie à des niveaux très divers. Elle est composée d'une série de 10 réactions catalysées par des enzymes qui dégradent une molécule de glucose (6 carbones) en deux molécules de pyruvate (3 carbones).

Le glucose extracellulaire traverse la membrane érythrocytaire grâce à un système de transport passif et entre ensuite dans la voie d'Embden-Meyerhof après phosphorylation en glucose-6-phosphate sous l'action de l'hexokinase (HK). Une série de réactions enzymatiques présentées sur la *Figure 1,* le transforme ensuite en pyruvate.

La glycolyse peut être résumée en 2 grandes étapes :

- Phase préparatoire : une molécule de glucose est d'abord transformée en deux molécules trioses phosphate (glycéraldéhyde-3-phosphate) avec consommation d'énergie (2 molécules d'ATP)
- Phase de production d'ATP : conversion du glycéraldéhyde-3-phosphate en pyruvate avec production d'énergie (gain de 4 molécules d'ATP)

Le bilan énergétique est un gain net final de 2 ATP :

- 4 molécules d'ATP sont produites :
    - 2 lors de la réaction catalysée par la phosphoglycérate kinase (PGK)
    - 2 lors de la réaction catalysée par la PK
- Une molécule d'ATP est respectivement consommée par :
    - L'hexokinase
    - La phosphofructokinase (PFK)

En outre, la voie d'Embden-Meyerhof permet de régénérer la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) par l'intermédiaire de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, qui est utilisée :

- Pour la réduction du pyruvate en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH)
- Comme coenzyme de la méthémoglobine réductase physiologique
- Comme coenzyme accessoire de la glutathion réductase.

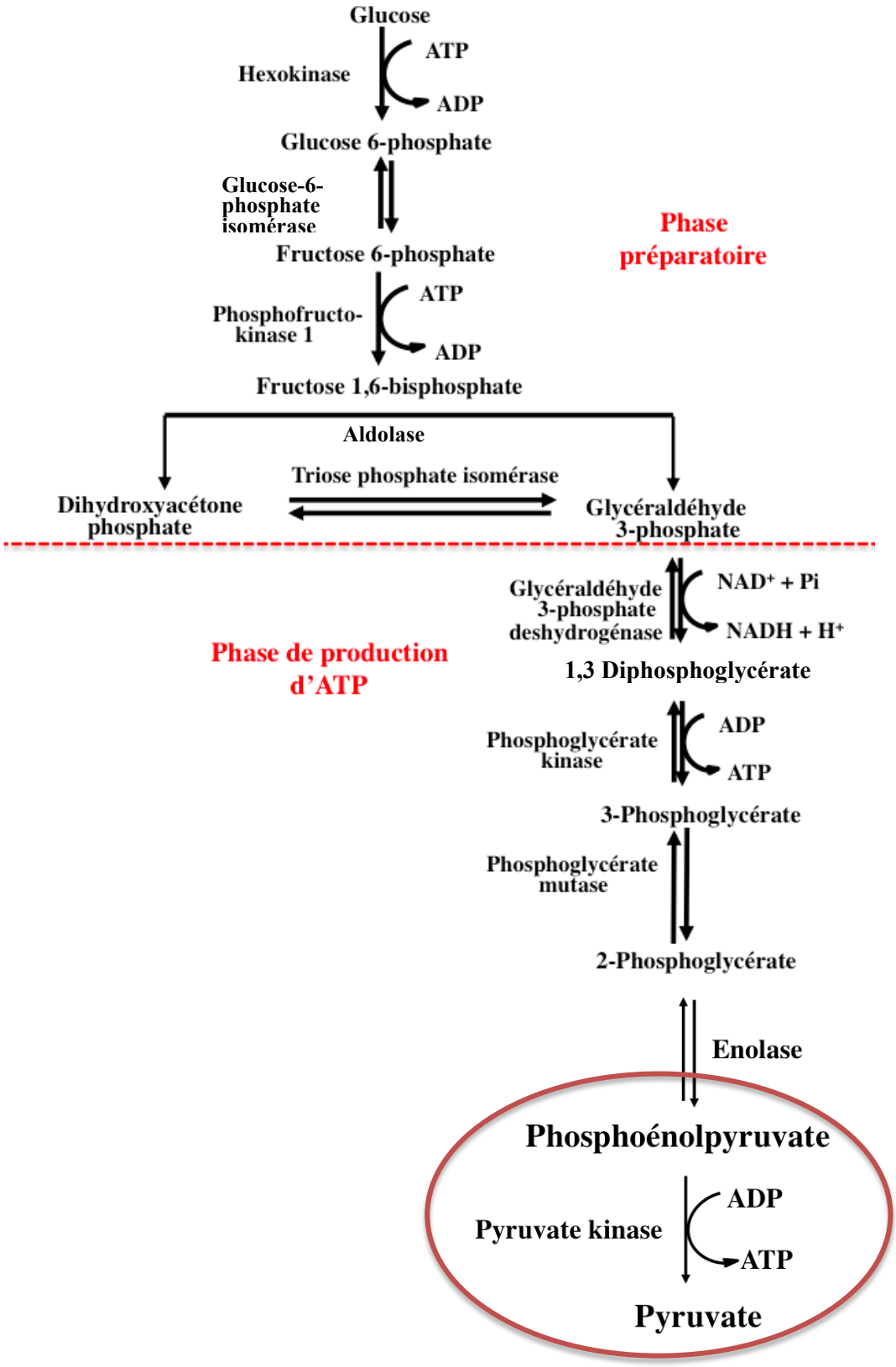


Figure 1 – *Les 10 étapes successives de la voie d'Embden-Meyerhof*

1.1.3. Voies métaboliques en dérivation

Deux voies sont branchées à la voie principale : le shunt des pentoses et le cycle du 2,3-diphosphoglycérate.

1.1.3.1. Le shunt des pentoses phosphate (ou des hexoses monophosphate) (*Figure 2*)

Cette voie (10% d'engagement), initiée par le nicotinamide-dinucléotide phosphate (NADP) maintient les capacités d'oxydoréduction du globule rouge en régénérant le NADPH (forme réduite) aux deux premiers temps du shunt des pentoses par l'activité de la G6PD et de la 6-phosphogluconate déshydrogénase

La NADPH est indispensable au cycle du glutathion, en charge de la détoxication des peroxydes. L'enzyme-clef est la glutathion peroxydase dont l'action aboutit à la formation de glutathion oxydé, ensuite régénéré sous l'action de la glutathion réductase, en présence NADPH.

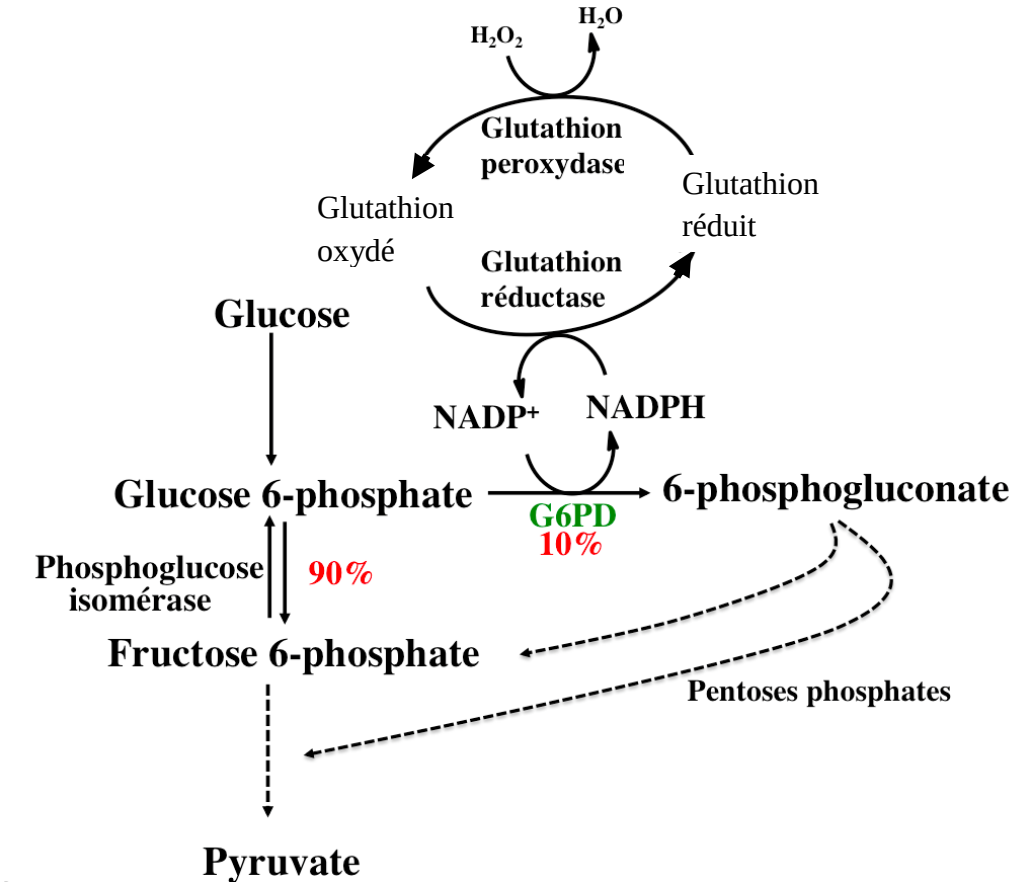


Figure 2 – *Shunt des hexoses et pentoses phosphate*

1.1.3.2. Le cycle du 2,3-diphosphoglycérate de Rapoport et Luebering (Figure 3)

Cette voie branchée sur la voie de la glycolyse anaérobie, comprend deux étapes enzymatiques catalysées par une enzyme unique, bifonctionnelle :

- La première, catalysée par la 2,3-diphosphoglycérate mutase, aboutissant à la formation de 2,3-BPG
- La seconde, catalysée par la 2,3-diphosphoglycérate phosphatase, libérant du phosphore inorganique et produisant du 1,3-BPG qui rejoint la voie principale de la glycolyse.

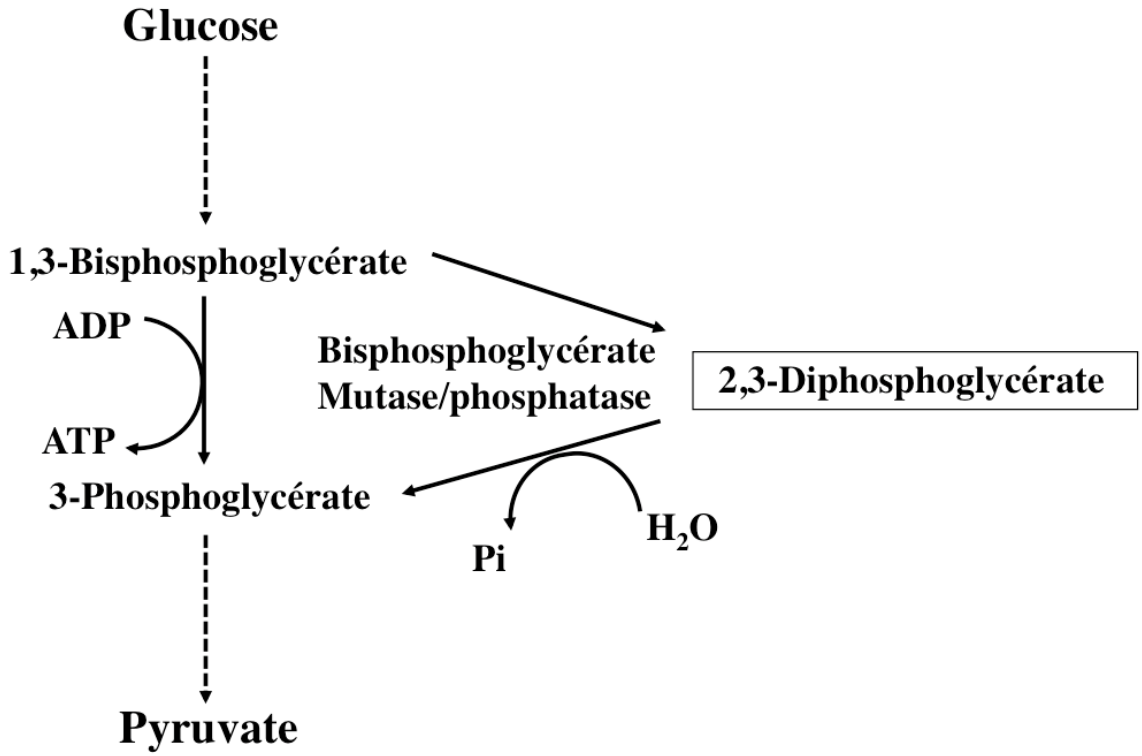


Figure 3 – *Cycle du 2,3-BPG*

Le 2,3-BPG module l'affinité de l'Hb pour l'oxygène en se fixant dans la poche centrale de la molécule de désoxyhémoglobine (l'oxyhémoglobine ne fixant pas le 2,3-BPG par modification conformationnelle).

Au cours d'un déficit en PK, l'accumulation du 2,3-BPG (métabolite intermédiaire en amont) tend à maintenir l'hémoglobine dans sa forme désoxygénée, et réduit son affinité pour l'oxygène qui est donc libéré plus abondamment vers les tissus. La courbe de dissociation de l'oxygène est donc déviée vers la droite (3,4) (voir *Figure 4*).

Le taux de 2,3-BPG dans le GR est non seulement un effecteur allostérique de la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine, mais il joue aussi un rôle dans la régulation de la glycolyse :

- Inhibition de l'hexokinase, de la phosphofructokinase, notamment,
- Activation de la phosphoglycérate kinase.

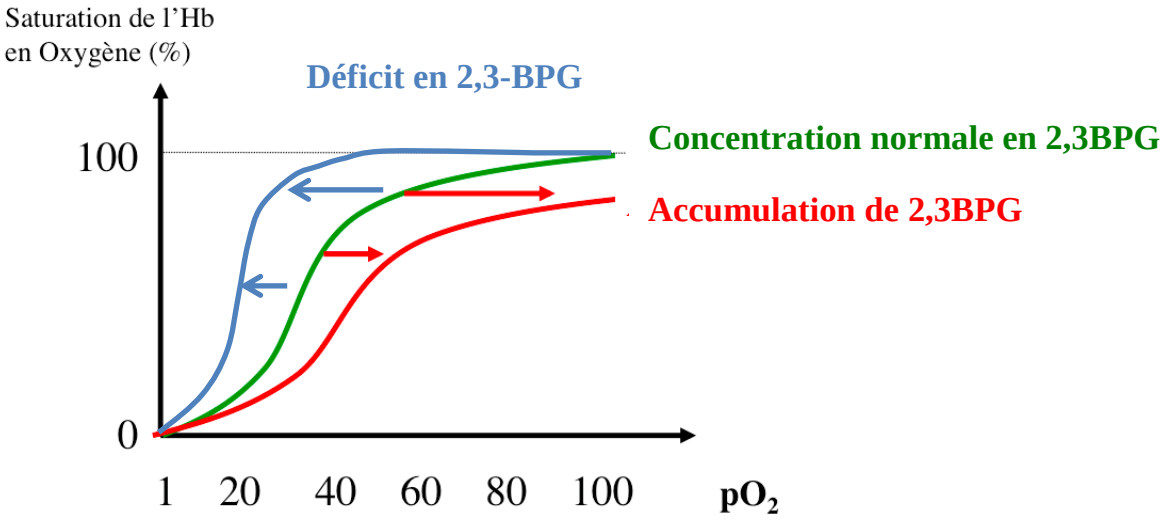


Figure 4 – *Effet d'une accumulation de 2,3-BPG sur la courbe de dissociation de l'oxygène*

- Dans le déficit en PK : accumulation de 2,3-BPG => courbe décalée vers la droite, meilleure tolérance de l'anémie par hausse de l'oxygénation des tissus
- Dans le déficit en hexokinase (*voir partie 1.3.1.2.*) : déficit en 2,3-BPG associé => courbe décalée vers la gauche, moindre tolérance de l'anémie par oxygénation des tissus abaissée

1.1.4. Régulation de la glycolyse intraérythrocytaire, étapes limitantes

La glycolyse intraérythrocytaire est régulée par l'activité des enzymes de la voie principale d'Embden-Meyerhof. La plupart d'entre elles ne sont pas limitantes, car dotées d'une activité potentielle bien supérieure aux besoins. Cette activité est plus élevée dans les réticulocytes et les hématies jeunes que dans les populations érythrocytaires d'âge moyen.

Les étapes régulatrices de la voie d'Embden-Meyerhof sont celles catalysées par :

- L'hexokinase, dont la situation en amont de la glycolyse lui confère de réguler le nombre de moles de glucose engagées en fonction de sa propre concentration. Elle est régulée négativement par le glucose-6-phosphate,
- La phosphofructokinase est une enzyme dont l'importance est centrale, et qui est contrôlée par une multitude de régulateurs allostériques :
    - Régulation positive, principalement par le fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP) et l'ADP
    - Régulation négative par le PEP et l'ATP, notamment
- La pyruvate kinase :
    - Régulée positivement par le fructose-1,6-bisphosphate F1,6BP et le phosphénolpyruvate (PEP)
    - Régulée négativement par l'ATP, le citrate et l'alanine

1.2. Pyruvate kinase : enzyme-clef de la glycolyse intraérythrocytaire

1.2.1. Généralités

Cette enzyme est ubiquitaire, isolée à la fois chez les eucaryotes et les procaryotes avec une structure très conservée.

L'architecture de la PK a été premièrement présentée en 1975 dans le muscle du chat (5) (Felis *silvestris*). Sa structure générale présente de nombreuses homologies dans les multiples et diverses cellules procaryotes ou eucaryotes où elle a été depuis isolée et décrite (6–12) : c'est une protéine homotétramérique dans la plupart des cas, notamment chez l'Homme.

Cependant, des PK monomériques, Selenastrum *minutum* (algue verte) (13), homodimériques Zymomonas *mobilis* (bactérie anaérobie) (14), Schizosaccharomyces *pomb*e (levure) (15), hétérohexamériques Brassica *napus*, (plante à fleurs jaunes) (16), homodécamériques Selenastrum *minutum,* (autre algue verte) (17) ont été rapportées.

Un arbre phylogénétique (18) de la pyruvate kinase est présenté en *Annexe 1*. Les PK sont regroupées en fonction des taxons où elles ont été isolées.

Les très rares organismes dépourvus de PK (notamment Entamoeba *histolytica* (19)), sont dotés d'un substitut : la pyruvate phosphate dikinase (PPDK), dont les propriétés et le fonctionnement sont quelques peu différentes mais dont la fonction finale est identique.

1.2.2. Etape catalysée

La PK (ATP-pyruvate 2-O-phosphotranferase, notée EC 2.7.1.40) est une enzyme-clef de la voie de la glycolyse. Elle catalyse la transphosphorylation irréversible du phosphoenolpyruvate (PEP) et de l'ADP en pyruvate et ATP (voir *Figure 2*). Le pyruvate produit est ensuite engagé dans plusieurs voies métaboliques, ce qui fait de cette étape réactionnelle un véritable carrefour métabolique.

L'irréversibilité de la réaction confère à la PK un pouvoir régulateur. Cette étape est donc limitante au même titre que les deux autres étapes « barrages » catalysées par l'HK et la PFK en amont (20).

Elle est dépendante de cations bivalents (Mg^{2+} ou Mn^{2+}) et surtout monovalents (K^{+}). Les ions K^{+} sont en effet indispensables à la conformation active de l'enzyme, mais sont également les garants de la fixation du PEP et de l'ADP au site actif (21).

$$\mathrm{PEP} + \mathrm{Mg.ADP} + \mathrm{H}^{+} \xrightarrow{Mg^{2+},K^{+}} \mathrm{Mg.ATP} + \mathrm{Pyruvate}$$

1.2.3. Isoenzymes isolées chez l'Homme

Quatre isoenzymes de PK sont actuellement connues et coexistent.

- PK-R et PK-L d'une part, toutes deux codées par *PKLR*
- PK-M1 et PK-M2 d'autre part codées par *PKM*

1.2.3.1. PK-R et PK-L

Les formes PK-R (574 acides aminés), spécifique de l'érythrocyte, et PK-L (531 acides aminés), dominante au niveau hépatique d'abord, puis rénal (cortex), et intestinal sont codées par le même gène *PKLR*, situé en 1q21(22). L'expression génique est orientée par un promoteur alternatif vers PK-R ou PK-L.

Dans l'érythroblaste basophile, PK-R et PK-M2 sont toutes les deux exprimées, puis avec la différenciation, PK-R prend progressivement le dessus sur PK-M2 (23,24). Cette inversion est non-seulement due à une augmentation de la synthèse de PK-R au détriment de PK-M2, mais également à la modulation inverse de la protéolyse des deux isoenzymes (25) (voir *Figure 5*)

On distingue ensuite deux sous-types de PK-R (24) :

- PK-R1 dans les réticulocytes, et les hématies les plus jeunes : homotétramère composé de 4 sous-unités PK-R (63 kDa) appelées L' (L'_4)
- PK-R2 qui prime dans les globules rouges les plus matures : hétérotétramère composé de 2 sous-unités L' et de 2 sous-unités L (57 à 58 kDa) issues de la protéolyse de sous-unités L' ($L_2L'_2$) (26)

L'activité de PK-R diminue avec le vieillissement physiologique du globule rouge.

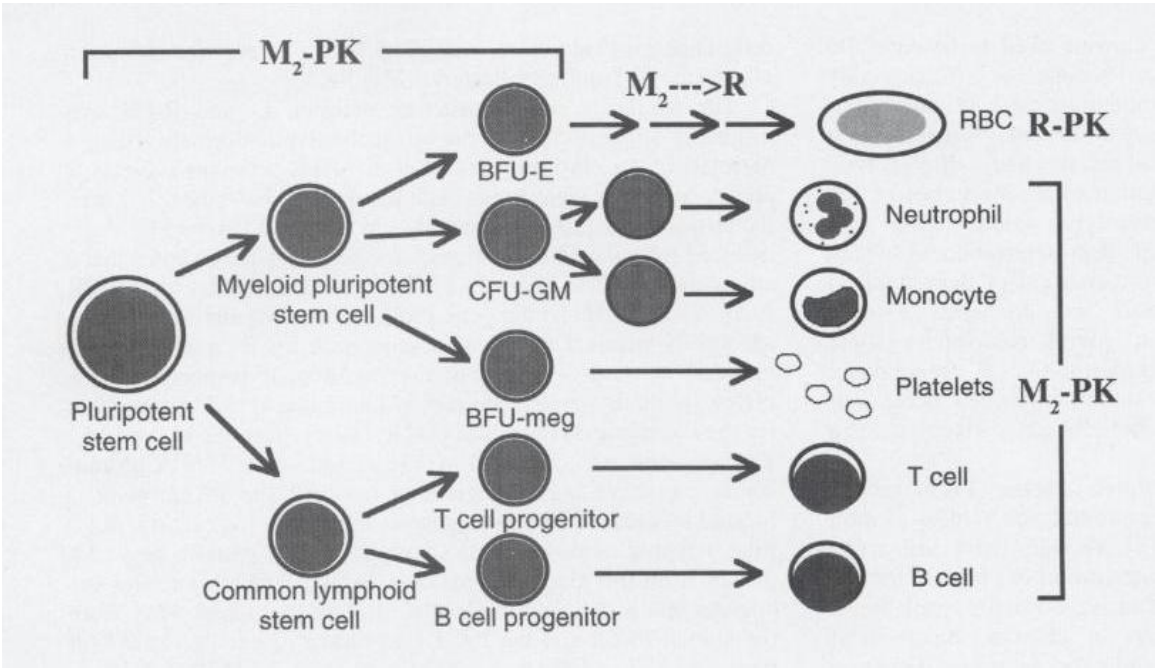


Figure 5 – *Isoenzymes de PK exprimées au cours de l'hématopoïèse*

1.2.3.2. PK-M1 et PK-M2

PK-M1 (378 acides aminés) et PK-M2 (434 acides aminés) sont également codées par un gène identique, *PKM*, dont le locus est en 15q22. PKM est composée de 2 exons et 11 introns, l'exon 9 étant spécifique de M1 et l'exon 10 de M2 par épissage.

- PK-M1 est majoritaire au sein des muscles striés squelettiques, des tissus myocardiques et cérébraux.
- PK-M2 est prépondérante dans les plaquettes et les leucocytes matures, mais aussi au niveau pulmonaire, splénique, rénal et au sein des tissus adipeux. M2 est aussi dominante au cours de la vie foetale précoce et dans les cellules en cours de maturation, notamment les progéniteurs de la lignée érythrocytaire. Elle persiste ensuite avec une activité résiduelle faible, supplantée par d'autres isoenzymes exprimées dans les cellules matures, à l'image de PK-R dans l'hématie du sujet sain.

1.2.4. Structure de la PK-R humaine

La description de la PK-R humaine est récente (2002). Il s'agit d'un homotetramère (voir *Figure 7*) dont le poids moléculaire est de 200kDa. Ses quatre sous-unités (monomères, ou protomères), identiques, sont chacune constituées de l'enchaînement de 574 acides aminés, et se décomposent en quatre domaines (voir *Figure 6*) (27):

- Domaine N-terminal, hélicoïdal (57→84)
- Domaine A, organisé en tonneau $(\beta/\alpha)_8$ (85→159 et 263→431)
- Domaine B composé de 9 feuillets β formant un tonneau (160→262)
- Domaine C formé de 5 hélices α et 5 feuillets β (432→574)

Les domaines A et C (partageant une liaison covalente), et dans une moindre mesure, le domaine N (une liaison covalente avec le domaine A), forment le corps des monomères. En revanche, le domaine B est relié de façon marginale (deux liaisons covalentes avec le domaine A) au reste de la sous-unité et adopte des orientations légèrement variables sur une amplitude de 4 degrés selon une mécanique impliquant K^+ (21). Le site actif de l'enzyme est situé à l'interface entre les domaines A et et B.

Le domaine C comporte un site de fixation pour le F1,6BP qui assure une régulation allostérique positive de l'activité pyruvate kinase en changeant sa conformation.

La localisation de PK-R au sein de l'hématie humaine est préférentiellement membranaire. En effet, de récents travaux (28) suggèrent l'existence d'un complexe glycolytique enzymatique objectivé par immunofluorescence. Une concentration d'enzymes glycolytiques organisées en complexes multimériques, a été observée à proximité de l'extrémité N-terminale des protéines membranaires de bande 3. Contrairement à d'autres enzymes glycolytiques, PK-R ne dispose pas d'un site de liaison propre aux protéines de band 3, mais participe à ce complexe.

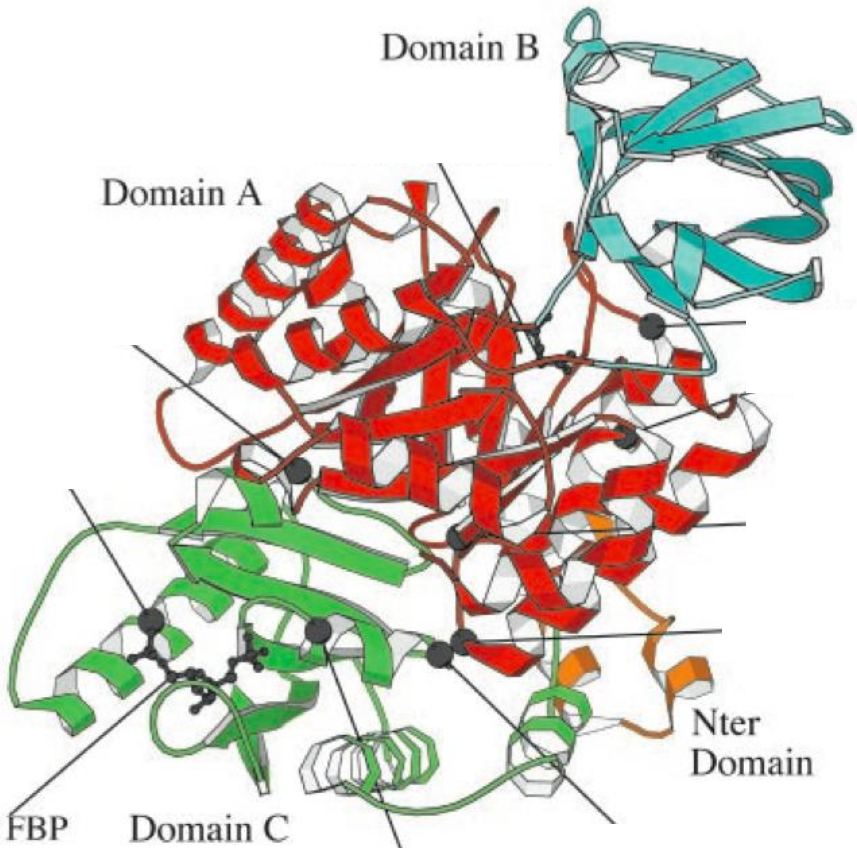


Figure 6 – *Représentation tridimensionnelle d'un monomère de pyruvate kinase intraérythrocytaire*

Domaine A, en rouge; domaine B, en bleu-ciel; domaine C, en vert; domaine N-terminal, en orange

(Source : Valentini G. et al. *J. Biol. Chem.* 2002 (27))

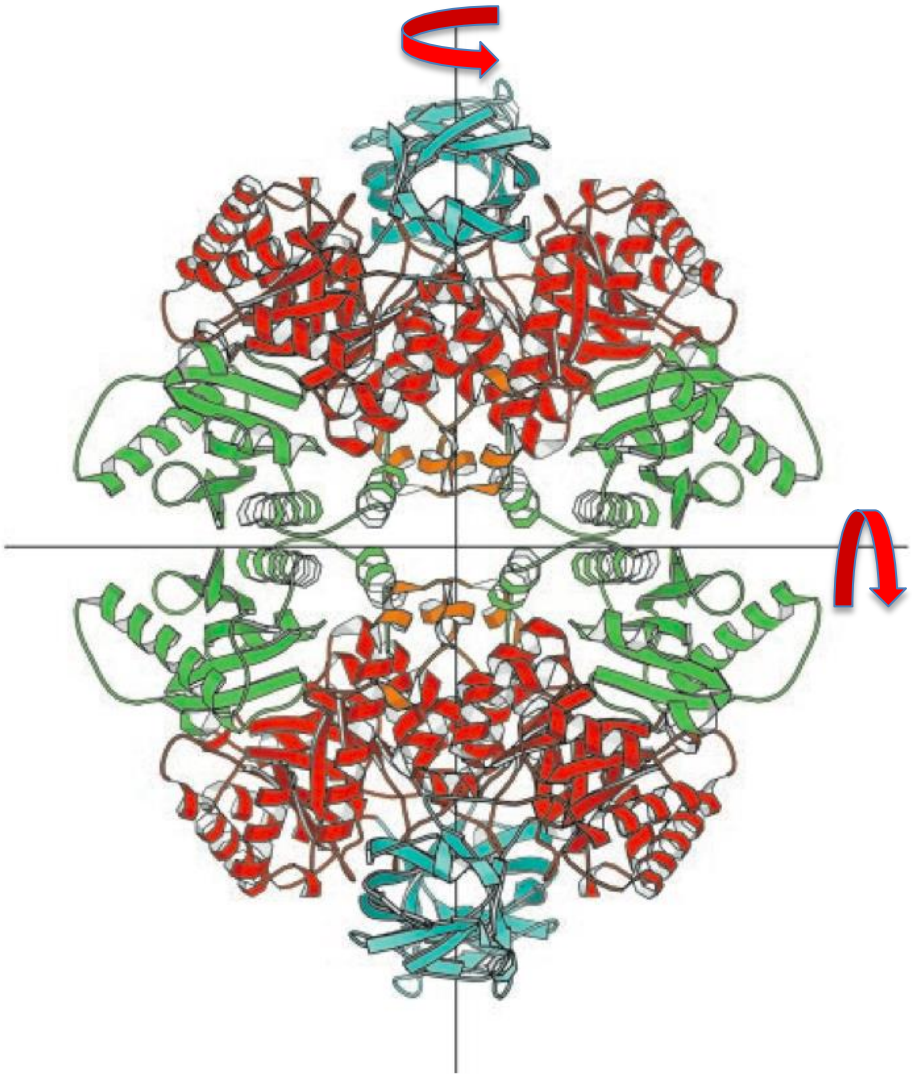


Figure 7 – *Structure tridimensionnelle de la PK-R*

Domaine A, en rouge; domaine B, en bleu-ciel; domaine C, en vert; domaine N-terminal, en orange

(source : Valentini G. et al. *J. Biol. Chem.* 2002 (27))

1.2.5. Régulation physiologique de l'activité de la PK

L'activité de la PK est sous la dépendance d'un grand nombre d'effecteurs incluant les cofacteurs Mg^{2+}, Mn^{2+}, et K^{+}. En outre, ses propriétés allostériques l'orientent vers une relation non-Michélienne, mais sigmoïdienne avec son substrat. Elle est régulée positivement par des effecteurs hétérotropiques (ce qui signifie que l'effecteur est différent du substrat), dont le principal est le F1,6BP.

Commençons par rappeler que les enzymes allostériques ont la propriété de changer de conformation spatiale, par liaison d'un effecteur à distance du site actif. Cette transition entraîne une modification de l'activité enzymatique.

La régulation allostérique de l'activité enzymatique permet une coopération fine entre les diverses voies métaboliques et de signalisation cellulaires. PK-R, tout comme PK-L et PK-M2 (PK-M1 n'est pas régulé allostériquement), sont régulées positivement par le F1,6BP dont la production est catalysée par la PFK. En revanche, l'ATP exerce une régulation négative sur l'activité de PK-R (26,29).

Dans le plan, les quatre monomères assemblés forment un homotétramère comprenant deux axes orthogonaux de symétrie axiale (l'un vertical, l'autre horizontal). Ces axes correspondent à des interfaces entre les sous-unités (30–32):

- L'interface A/A′ impliquant les domaines A correspond à un axe vertical
- L'interface C/C′ impliquant les domaines C au niveau d'un axe horizontal

Des mouvements rotatoires concertés au niveau des interfaces-clef A/A' et C/C' et de l'interdomaine A/B (30) permettent la transition entre deux états conformationnels : R et T.

Le F1,6BP engage la PK vers sa conformation R, « relax » (état actif, de haute affinité pour le PEP et K+). A l'inverse, l'ATP l'engage vers sa conformation T « tight » (état inactif, d'affinité effondrée). Par conséquent, l'activité de la PK est régulée par un ratio F1,6BP/ATP (33).

Cette transition nécessite la combinaison, présentée sur la *Figure 8* (34) :

- D'une rotation des domaines B et C de 17° et 15° respectivement
- D'une rotation de chaque sous-unité du tétramère de 16°

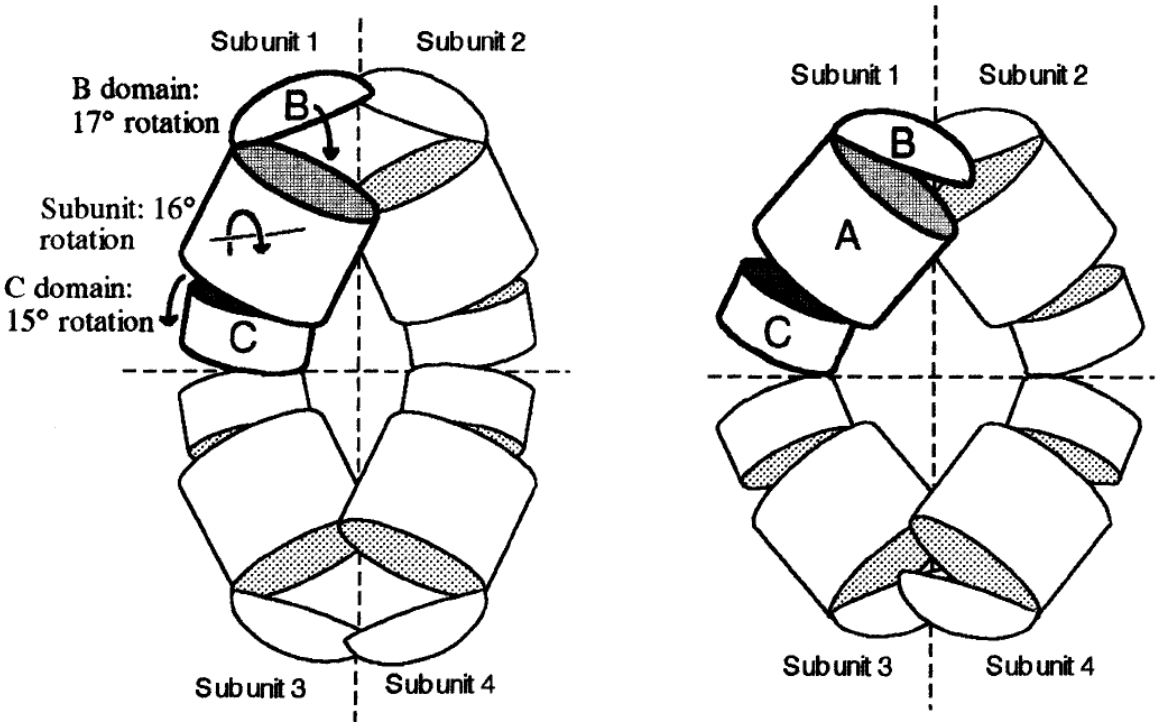


Figure 8 – *Transition conformationnelle de la pyruvate kinase :*
à gauche en conformation "T" et à droite en conformation "R".
(Source : Mattevi A., et al. *FEBS Lett*, 1996 (34)).

Le F1,6BP est le principal régulateur allostérique positif de l'activité de PK-R. Fixé au domaine C, il influence indirectement l'affinité du substrat pour le site actif, via un cation divalent qui joue le rôle de médiateur avec le PEP (35).

Les propriétés cinétiques de la transition entre les états R et T suivent les principes du modèle de Monod (36) fondé sur quatre principes :

- Les protomères (monomères) sont équivalents afin que l'oligomère (ici un tétramère) possède au moins un axe de symétrie
- La conformation de chaque protomère existe en (au moins) deux états conformationnels désignés R et T en équilibre
- Les états possèdent des affinités différentes pour un ligand donné. Seul le changement conformationel modifie l'affinité d'un protomère pour un ligand.
- La transition conformationnelle R→T ou T→R conserve la symétrie de l'oligomère

Dans ce modèle, il existe une coopérativité positive impliquant que la liaison d'un ligand provoque une transition concertée dans toutes les sous-unités vers la forme qui possède une affinité plus élevée pour le ligand.

Ainsi, plus la concentration en PEP est élevée, plus la PK s'engage vers un état conformationnel actif « R ». Ainsi, l'affinité de la PK pour le PEP se traduit par une courbe sigmoïdienne.

Toujours en accord avec le modèle de Monod, la vitesse maximale de la PK, V_{max} (vitesse maximale que peut atteindre la réaction lorsque l'enzyme est saturée de substrat), est inchangée dans les états conformationnels R et T. Ainsi, l'enzyme présente une constante catalytique k_{cat} (nombre de moles de pyruvate formées par seconde et par mole d'enzyme, k_{cat}= V_{max}/mole d'enzyme) identique en présence ou en l'absence d'effecteurs.

En revanche, l'affinité de la PK pour le PEP (équivalent de K_m), et le degré de coopérativité entre les protomères (coefficient de Hill), sont affectés par la présence d'effecteurs :

- Le F1,6BP tend à augmenter l'affinité et la coopérativité (voir *Figure 9*)
- L'ATP inhibe l'activité de PK-R en diminuant l'affinité du PEP et la coopérativité

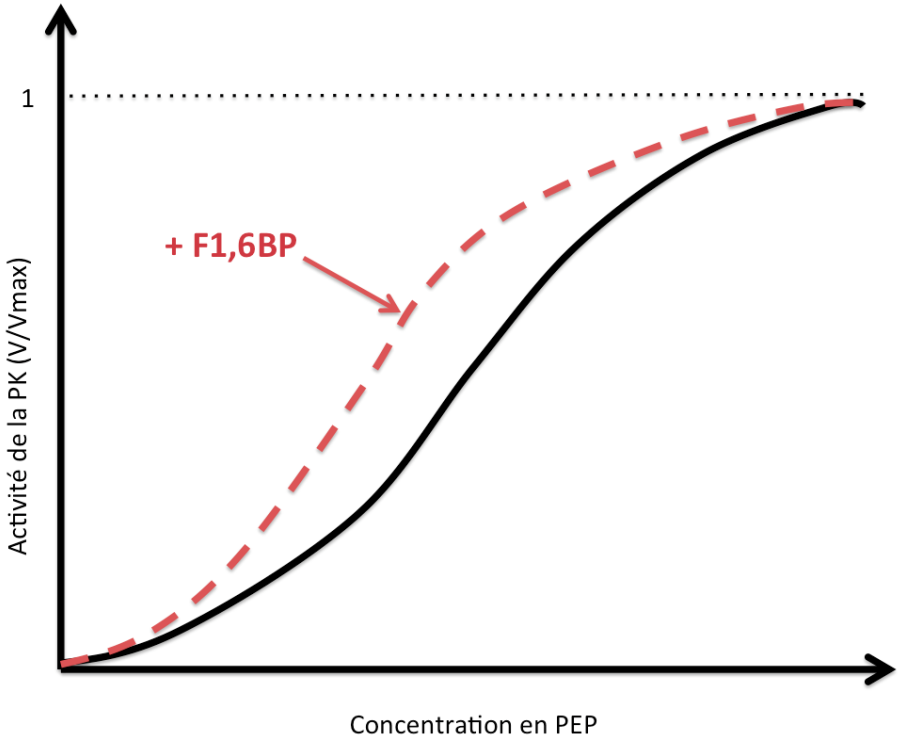


Figure 9 – *Effet du fructose-1,6-biphosphate sur l'activité de la pyruvate kinase*

1.3. Déficit en pyruvate kinase intraerythrocytaire : épidemiologie, physiopathologie, diagnostic.

Au cours de sa maturation, le globule rouge perd ses organites (après le stade de réticulocyte) et sa survie ne dépend plus que de son équipement enzymatique non-renouvelable et d'une source d'énergie limitée à la voie anaérobie de la glycolyse.

Contrairement au déficit en G6PD, enzyme-clef de la voie des pentoses (plusieurs centaines de millions de sujets sont atteints), les enzymopathies affectant la voie métabolique d'Embden-Meyerhof sont rares.

Le déficit en PK intraérythrocytaire, enzymopathie la plus fréquente de ce groupe, ne concerne que quelques centaines, voire quelques milliers de patients dans le monde. Les sujets hétérozygotes pour ces anomalies sont généralement asymptomatiques et les malades sont des homozygotes ou des hétérozygotes composites.

La corrélation entre le degré d'altération enzymatique et l'importance de la dysfonction dépend de plusieurs critères :

- L'importance de l'expression du mutant
- La stabilité du mutant
- L'hyperexpression compensatrice d'une isoenzyme ou l'usage d'une voie métabolique alternative.

1.3.1. Epidémiologie

1.3.1.1. Prévalence

La prévalence des mutations de *PKLR* a d'abord été estimée par mesure d'activité de la PK :

- L'homozygotie ou d'hétérozygotie composite à l'origine de la maladie, (activités effondrées) ont une prévalence de 3,3 par million d'habitant selon Carey et al. (37) (population britanique du nord).
- La prévalence de la mutation à l'état hétérozygote (activités diminuées de moitié par rapport aux patients non-mutants) a été rapportée à 1,4% (38) (étude allemande sur 214 patients sains) et 1,03% (39) (étude américaine sur 2020 nouveau-nés).

Ces statistiques sous-estiment probablement le nombre de cas en raison de l'importante variation interindividuelle des activités enzymatiques, dont certaines peuvent être faussement normales, et car non-corrélées à l'activité d'une autre enzyme érythrocytaire.

Le génotypage est la méthode la plus sensible et la plus spécifique pour objectiver le diagnostic. Beutler et al. estiment la prévalence de la mutation à l'état homozygote ou hétérozygote composite, par extrapolation de prévalence des mutations les plus fréquentes après génotypage : 51 individus seraient déficitaires par million de patients issus de la population blanche américaine, soit 1 cas pour 20000 individus (40).

Contrairement au déficit en G6PD, le déficit en PK est cosmopolite. Sa prévalence augmente dans les communautés à fort taux de consanguinité (41,42).

1.3.1.2. Place du déficit en PK par rapport aux autres enzymopathies érythrocytaires à l'origine d'hémolyse chronique congénitale non-sphérocytaire

Le déficit en PK est l'enzymopathie érythrocytaire la plus fréquente après le déficit en G6PD. C'est aussi la première cause d'anémie hémolytique congénitale chronique non-sphérocytaire.

La *Figure 10* situe le déficit en PK par rapport aux autres enzymopathies entrainant une hémolyse congénitale chronique non-sphérocytaire.

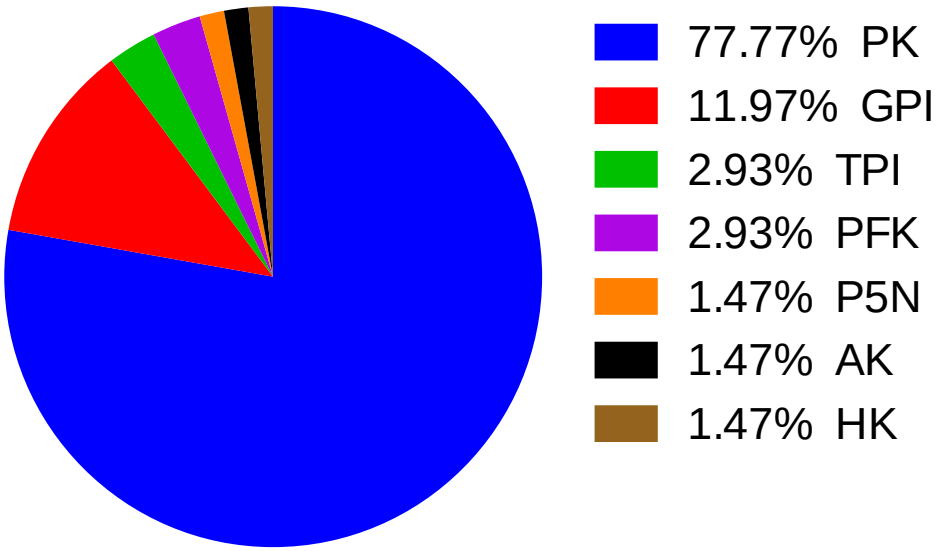


Figure 10 – *Place du déficit en PK par rapport aux autres enzymopathies érythrocytaires à l'origine d'hémolyses chroniques non sphérocytaires.*
(D'après Leporrier M., *Traité de Médecine*, EMC - AKOS, 2013 (43))

Le déficit en PK est de loin, la première étiologie, puisque ces enzymopathies sont beaucoup moins fréquentes, voire extrémement rares. Voici une brève présentation de ces déficits enzymatiques intraérythrocytaires d'après les données publiées par l'*European Network for Rare and Congenital Anaemias*, (ENERCA) :

- Le **déficit en glucose-6-phosphate isomérase (GPI)** est la seconde enzymopathie après le déficit en PK (en terme de fréquence). La GPI permet la conversion du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate. Environ 50 cas ont été décrits. C'est un déficit autosomique récessif associé à une anémie hémolytique modérée à sévère. Plus rarement, des troubles neurologiques défitaires sont présents : retard mental de degré variable, hypotonie, faiblesse musculaire, ataxie et dysarthrie.

- Le **déficit en triose phosphate-isomérase (TPI)** est très rare, seulement 30 cas ont été décrits dans le Monde. Il est transmis sur le mode autosomique récessif. La TPI catalyse l'isomérisation réversible de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). Le déficit conduit à une anémie hémolytique de degré variable, toujours associée à une atteinte neurodégénérative et à une myopathie sévères (paralysie diaphragmatique, cardiomypathie) d'apparition précoce (vers le 6ème mois de vie). En outre une susceptibilité aux infections (sepsis sévère fréquent) altère souvent le pronostic vital.

- Le **déficit en phosphofructokinase (PFK)**, ou Maladie de Tarui, a une transmission autosomique principalement récessive, et plus rarement dominante. Cette pathologie est rare (une trentaine de cas rapportés) et surtout décrite au Japon et chez des juifs ashkénazes. La PFK catalyse la conversion irréversible du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-bisphosphate. C'est une enzyme clef de la régulation de la glycolyse (étape limitante). Le déficit en PFK altère le métabolisme musculaire et entraine des myalgies, avec faiblesse musculaire et crampes au cours de l'exercice physique intense, associées à une anémie hémolytique chronique modérée à sévère, et à une myoglobinurie (urines foncées).

- Le **déficit en 5'Pyrimidine nucléotidase (P5N)** est rare et concerne le catabolisme des nucléotides pyrimidiques (uridine monophosphate et cytidine monophosphate) qui proviennent principalement de la dégradation de l'ARN au cours de la maturation érythrocytaire. Il s'agit d'une maladie autosomique récessive caractérisée par une anémie hémolytique chronique. Ce déficit est généralement associé à la présence de nombreuses ponctuations basophiles dans les globules rouges. Dans de très rares cas, des difficultés d'apprentissage ont été rapportées.

- Le **déficit en adenylate kinase (AK)** est rare et rapporté dans 9 familles non apparentées (d'après l'ENERCA). C'est une maladie autosomique récessive qui entraîne une anémie hémolytique parfois accompagnée de troubles neurologiques. L'adénylate kinase catalyse l'interconversion de l'AMP, ADP et ATP. Son altération entraine donc un déficit énergétique par insuffisance de conversion de l'ADP en ATP et AMP.

- Le **déficit en hexokinase (HK)** est très rare. Sa transmission est autosomique récessive. Il est généralement associée à une anémie hémolytique chronique sévère, avec une hémolyse néonatale pouvant être responsable de mort précoce. Il évolue parfois vers une anémie totalement compensée chez l'adulte. Les signes cliniques du déficit en HK sont voisins de ceux du déficit en PK. Néanmoins, la tolérance de l'anémie est souvent bien moindre, en raison d'un déficit en 2,3BPG (situé en aval dans la voie d'Embden-Meyerhof, voir *Figure 1*) avec décalage de la courbe de dissociation de l'oxygène vers la gauche (voir *Figure 4*). Dans quelques cas rares, le déficit en HK a été retrouvé associé à des syndromes malformatifs ou à un retard psychomoteur.

1.3.2. Du déficit en pyruvate kinase à l'hémolyse chronique

1.3.2.1. Physiopathologie

Le déficit en PK-R est responsable de deux principales altérations métaboliques :

- Une déplétion en ATP qui représente un déficit énergétique, impactant notamment la déformabilité.
- Un excès de 2,3-BPG, accumulé en amont, qui améliore paradoxalement la tolérance de l'anémie par l'abaissement de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (3).

Cependant, la physiopathologie du raccourcissement de la durée de vie des érythrocytes du patient déficitaire en PK n'est pas totalement décrite.

1.3.2.1.1. Déformabilité du globule rouge dans des conditions physiologiques

L'hématie humaine est un disque biconcave. Cette forme singulière ne dépend que de la membrane érythrocytaire, elle-même sous la dépendance du métabolisme érythrocytaire et de l'environnement extracellulaire.

Le globule rouge est doué, dans des conditions physiologiques, de « déformabilité » : il change réversiblement de forme sous l'influence de contraintes physiques internes ou externes.

En effet, dans sa forme discocytaire de 7 à 8 µm de diamètre, l'hématie ne peut transiter dans les vaisseaux capillaires à faible diamètre. Il est donc indispensable qu'il soit capable, dans le flux sanguin, de modifier sa forme en s'allongeant comme un cylindre du diamètre du capillaire, et qu'il puisse ensuite reprendre son aspect biconcave. Cette propriété est due à trois paramètres (44) :

- L'excès de surface membranaire par rapport au volume globulaire permettant la déformation
- La viscoélasticité membranaire en charge de la plasticité et de l'élasticité cellulaire
- La viscosité interne dépendante de la concentration et de la qualité de l'hémoglobine et du système de transfert transmembranaire de l'eau et des ions

La déformabilité du globule rouge est accrue par :

- La présence d'ATP, indispensable à des niveaux divers : pompes membranaires ATP-ase, dynamique de membrane…
- La phosphorylation des protéines membranaires par des protéines kinases, qui diminue la plasticité membranaire (45)

En rechanche, elle est diminuée au cours :

- D'un stress oxydatif (46) : oxydation de l'hémoglobine, pontage oxydatif de protéines rigidifiant la membrane, peroxydation des lipides.
- D'une accumulation de calcium intraérythrocytaire (47)
- D'un défaut de phosphorylation des protéines de membrane
- D'un déficit en ATP

1.3.2.1.2. Altération de la déformabilité érythrocytaire chez le patient déficitaire en PK

Outre l'altération d'étapes du métabolisme ATP-dépendantes, la déplétion en ATP intraérythrocytaire impacte la déformabilité (44) par :

- Atteinte de la viscosité interne : défaut de fonctionnement des pompes membranaires ATP-ases, altération des échanges "flip-flop" des phospholipides membranaires
- Défaut de phosphorylation des protéines membranaires, l'ATP étant donneur de groupe phosphoryle, entrainant une rigidification
- Inextractibilité de la spectrine (par formation de complexes macromoléculaires : polymères de spectrine et protéines de bande 4.1, 4.5, 4.9 et 5) (48)
- Augmentation de la quantité d'hémoglobine liée à la membrane (création de ponts disulfures)

L'ATP joue donc un rôle essentiel dans le maintien des interactions moléculaires normales et donc de la déformabilité érythrocytaire. L'hématie déplétée en ATP est ainsi plastique et faiblement déformable, ce qui conduit à sa destruction anticipée par le système réticuloendothélial.

1.3.2.1.3. Déficit en PK et érythropoïèse

Le déficit en PK impacte également la maturation des progéniteurs érythroïdes. L'étude histologique des organes hématopoïétiques du patient déficitaire en PK montre non-seulement une hématopoïèse augmentée, mais surtout une apoptose érythroïde intense aux stades de précoces de maturation des progéniteurs (49).

Des modèles murins ont permis de montrer que l'activité de PK-R était indispensable à la maturation des progéniteurs érythroïdes, par un effet anti-apoptotique (50). Les processus de glycolyse et d'apoptose apparaissent être liés.

En synthèse, les altérations secondaires au déficit en PK peuvent être donc rattachées à 2 grands cadres:

- D'une part une hémolyse chronique par altération de la déformabilité érythrocytaire conduisant à une destruction prématurée de l'hématie
- D'autre part un excès d'apoptose des progéniteurs érythropoïétiques

Le tableau clinique qui en résulte, varie de l'hémolyse sévère pouvant mettre en jeu le pronostic vital du nouveau-né, à une anémie hémolytique bien tolérée.

1.3.2.2. Présentation biologique et clinique

1.3.2.2.1. Historique

Les premiers travaux sur les enzymopathies de la voie de la glycolyse du globule rouge datent de 1953 et 1954 (51,52). Les pathologies décrites étaient hétérogènes et classées en 2 groupes en fonction :

- De la diminution de l'autohémolyse in vitro après ajout de glucose
- De la poursuite constante de l'hémolyse malgré le gain de glucose

Cependant, certaines pathologies présentaient des points communs : l'absence de sphérocytose, une résistance osmotique normale, l'absence d'hémoglobinopathie et un certain bénéfice apporté par la splénectomie.

Après découverte du déficit en G6PD en 1956 (53), Valentine et al. rapportent trois premiers cas d'anémie hémolytique congénitale non-sphérocytaire de type 2 (classification de Selwyn et Dacie, voir *Tableau 1*) qu'ils imputent au déficit en PK en 1961 (54).

Tableau 1 - *Classification des anémies hémolytiques*
(d'après Selwyn, J. G. , and Dacie, J. V. , *Blood,* 1954 (52))

Autohémolyse de type 1	**Autohémolyse de type 2**
• Faible hémolyse ou arrêt de l'hémolyse à 24 et 48h dans le milieu à 37°C saturé en glucose • Hémolyse discrètement augmentée à 24 et 48h dans le milieu témoin	• Hémolyse persistante malgré la saturation du milieu en glucose • Hémolyse augmentée à 24 et 48h dans le milieu témoin
• Hémolyse non-influencée par la saturation du milieu en ATP (55)	• Arrêt de l'hémolyse à saturation du milieu en ATP (55)
• Sphérocytose héréditaire • Déficit en G6PD (53) • Déficit en 2,3BPG (55)	• Déficit en PK (56)

1.3.2.2.2. Premières descriptions cliniques

Puis, en 1962, Tanaka et Valentine (56) présentent sept cas de déficit en PK (voir *Tableau 2*) diagnostiqués sur la base des critères d'autohémolyse de type 2 et de la mesure d'activité enzymatique de la PK. L'activité était effondrée par rapport aux sujets sains. Les membres de leurs familles réputés hétérozygotes, avaient une activité de niveau intermédiaire.

Tableau 2 - *Présentation de 7 patients déficitaires en PK* (d'après Tanaka KR., et al. *Blood*. 1962 (56))

N° du cas	Age en 1962	Sexe	Origines géographiques	Sévérité clinique	Âge au diagnostic	Splénec-tomie	Histoire clinique
1	26	Homme	Europe du Nord	Modérée	21	Oui	Découverte fortuite d'une anémie hémolytique par l'US Army. Transfusé une fois lors de la splénectomie. Mène une vie normale.
2	24	Homme	Grande Bretagne/ Allemagne	Mineure	19	Non	Bonne tolérance, plusieurs épisodes de cholécystite
3	25	Homme	Grande Bretagne/ Allemagne	Modérée	Enfance	Oui	Frère du cas n°2. Ictère constant. Tolérance modérée surtout dans l'adolescence mais ne requiert pas de transfusions
4	38	Femme	Irlande	Modérée à sévère	Enfance	Oui	Anémie néonatale. A été transfusée plus de 150 fois.
5	5	Femme	Grande Bretagne/ Pays Bas	Sévère	Enfance	Oui	Ictère néonatal. A été splénectomisée à 5 mois ce qui a diminué les besoins transfusionnels
6	2	Femme	Grande Bretagne/ Pays Bas	Sévère	Enfance	Non	Soeur du cas n°5. Transfusée 3 fois dans les 3 premiers mois de vie.Ictère intermittent. Splénomégalie.
7	2	Femme	Mexique	Modérée à sévère	Enfance	non	Ictère et splénomégalie au 2ème jour de vie. Transfusée toutes les 6 à 8 semaines.

D’autres équipes ont présenté des séries exposant des cas plus sévères que ceux de Tanaka et collaborateurs, notamment au sein d’une communauté Amish en Pennsylvanie (41,57) au sein de laquelle il existe une forte consanguinité (polygamie) propice à l’homozygotie.

Dans cette communauté Amish de Mifflin County, au moins 21 cas ont été décrits. Les parents des cas index étaient tous descendants directs d’un seul couple d’immigrés probablement hétérozygote (voir *Figure 8*). L’hémolyse était diagnostiquée au cours des deux premières années de vie et beaucoup d’enfants décédaient avant l’âge de 3 ou 4 ans. Une pâleur cutanéomuqueuse et un ictère étaient les principaux signes décrits par Bowman et collaborateurs. La splénomégalie apparaissait systématiquement au cours de la première année de vie chez tous les patients. L’hépatomégalie était plus inconstante. Les enfants étaient tous splénectomisés précocément ce qui permettait d’interrompre les transfusions. Les autopsies pratiquées sur les enfants décédés montraient une hématopoïèse extramédulaire importante (splénique et hépatique).

L’arbre généalogique de la communauté Amish de Mifflin County et présente les caractéristiques d’une maladie autosomique à transmission récessive (voir *Figure 11*).

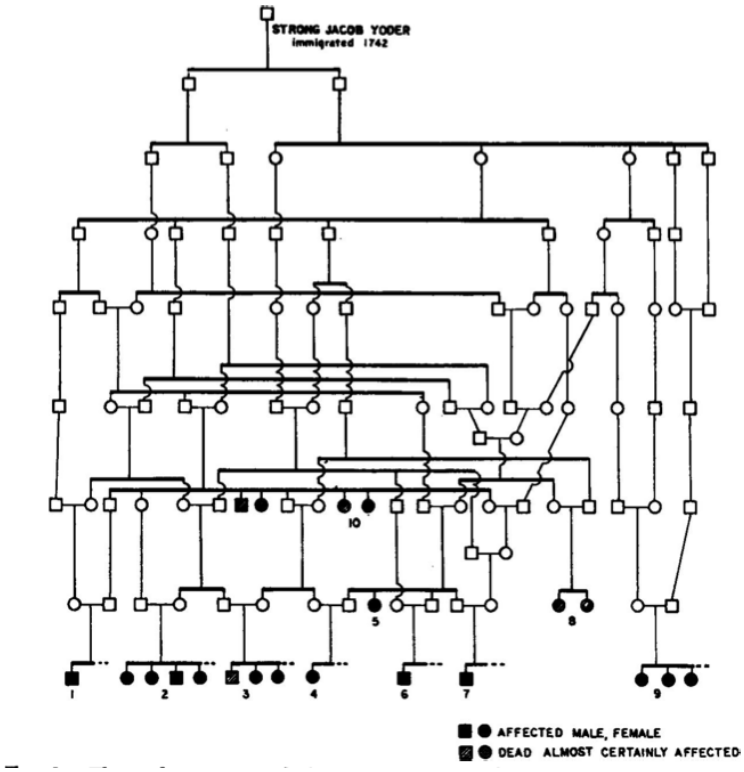


Figure 11 – *Arbre généalogique de la communauté Amish de Mifflin County*
(source : Bowman et al. *Am J Hum Genet*. 1965 (41))

1.3.2.2.3. Tableaux cliniques et biologiques

Les cas rapportés par Tanaka et Valentine et ceux décrits par Bowman montrent une grande diversité dans leur présentation, caractéristique du déficit en PK.

Il n'est donc pas possible d'exposer le tableau clinique et biologique typique du déficitaire en PK, et il faut se contenter de citer les signes fréquemment retrouvés. Globalement, le tableau est celui d'une anémie hémolytique chronique associant :

- Ictère cutanéomuqueux, à des degrés d'intensité divers
- Splénomégalie, inconstante
- Pâleur cutanée, variant avec le taux d'hémoglobine

La profondeur de l'anémie varie considérablement, allant de l'anémie très modérée à l'anémie néonatale potentiellement létale, avec ictère franc et nécessitant une exsanguinotransfusion ainsi qu'un support transfusionnel régulier ultérieur (58).

Lorsque le diagnostic est posé chez le nourrisson, l'anémie a ensuite une tendance vers l'amélioration spontanée. Chez l'adulte, le taux d'hémoglobine est relativement constant. Des exacerbations occasionnelles peuvent se produire au cours des infections aiguës et au cours de la grossesse laissant paraître les autres signes du syndrome anémique : asthénie, dyspnée, tachycardie…

Les signes biologiques évocateurs, mais non-spécifiques car communs à l'ensemble des anémies hémolytiques, sont :

- Anémie normochrome, normocytaire ou macrocytaire
- Réticulocytes >120 G/L
- Haptoglobine sérique abaissée voir effondrée
- LDH sérique élevées
- Bilirubine libre augmentée

1.3.2.2.4. Démarche diagnostique

La démarche diagnostique chez le nouveau-né ne peut-être comparée à celle qui sera conduite chez l'enfant ou l'adulte. En effet, des étiologies d'hémolyse plus fréquentes en période néonatale doivent être absolument écartées.

1.3.2.2.4.1. En période néonatale et chez le nourrisson

Des examens biologiques à visée étiologique doivent alors être demandés en anticipant les examens biologiques nécessaires pour éviter les prélèvements multiples.

L'examen du frottis sanguin est indispensable à la recherche de d'anomalies qualitatives des élements figurés du sang ou de cellules anormales.

On exclura en priorité une anémie hémolytique immune par un test direct à l'antiglobuline (TDA, ou test de Coombs). Ce test permettra d'éliminer une incompatibilité fœtomaternelle, cause majeure d'hémolyse et d'ictère chez le nouveau-né :

- Incompatibilité ABO induisant un ictère intense et surtout une anémie tardive au cours des 2‑3 premiers mois de vie
- Incompatibilité rhésus (Rh) responsable d'un ictère intense, précoce, avec hyperbilirubinémie
- Incompatibilité dans les autres systèmes (Kell, Duffy…)

Puis, il faudra évoquer une anémie hémolytique constitutionnelle et réaliser les examens nécessaires avant toute transfusion :

- Les causes les plus fréquentes sont :
    - La sphérocytose héréditaire : test de résistance osmotique et éventuel marquage des hématies à l'éosine-5'-maléimide (EMA) en cytométrie de flux
    - Le déficit en G6PD en priorité : mesure d'activité enzymatique
- Il faudra éliminer une hémoglobinopathie par électrophorèse de l'hémoglobine :
    - L'alpha-thalassémie peut entraîner une anémie hémolytique néonatale (microcytaire)
    - La bêtathalassémie et la drépanocytose s'expriment plus tard (lorsque l'HbA devient prédominante)

Le déficit en PK peut évoqué dès le début du raisonnement, notamment dans un contexte familial avec mesure d'activité PK immédiate. Cependant, la plupart du temps, il n'est suspecté qu'après élimination des causes sus-citées par des examens paracliniques adaptés.

La *Figure 12* résume le raisonnement à mener face à une anémie hémolytique du nouveau-né.

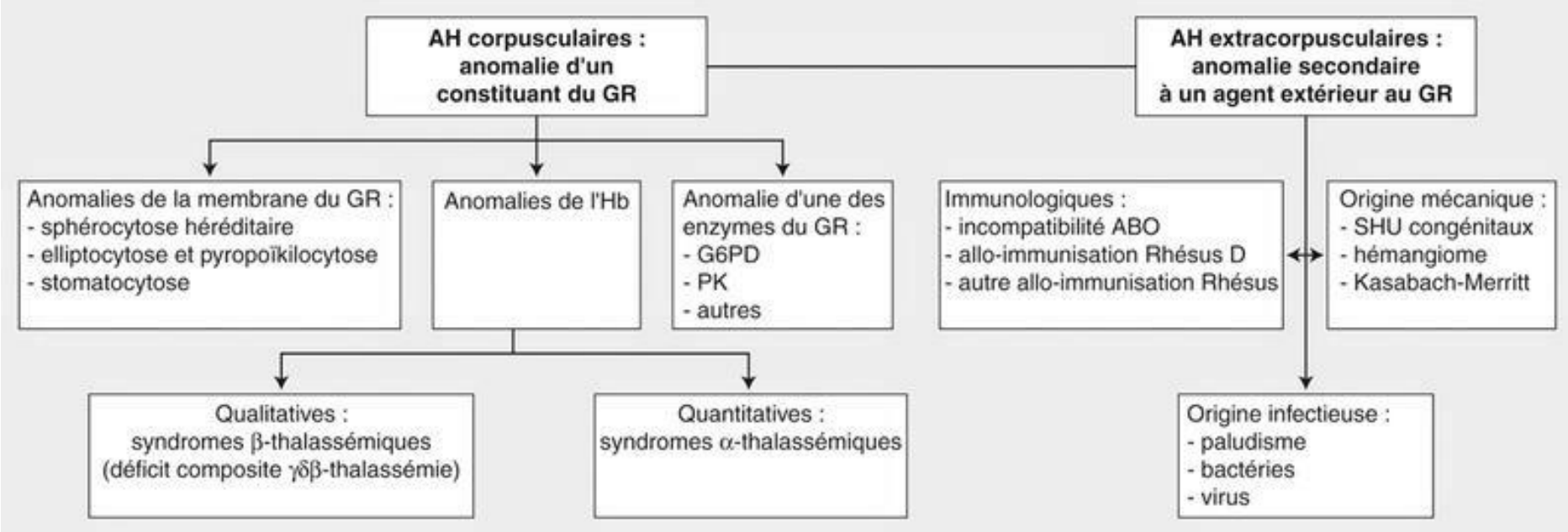


Figure 12 – *Démarche diagnostique devant une anémie hémolytique du nouveau-né/nourrisson*

(source : Da Costa et al., *EMC - Pédiatrie - Maladies infectieuses*, 2011(59))

1.3.2.2.4.2. Chez l'enfant et l'adulte

Dans la plupart des cas, le diagnostic est posé dans le cadre des investigations autour d'une anémie hémolytique à présentation plutôt chronique, intratissulaire (par opposition à l'hémolyse aiguë intravasculaire, voir *Tableau 3*).

Tableau 3 - *Eléments orientant vers une hémolyse intravasculaire ou intratissulaire*
(D'après Loustau V., *La Presse Médicale*, 2011)

Hémolyse aiguë, intravasculaire	**Hémolyse chronique, intratissulaire**
• Syndrome anémique bruyant • Installation aiguë et brutale • État de choc / hypotension • Hémoglobinurie • Ictère souvent retardé	• Syndrome anémique d'intensité variable • Installation subaiguë voire chronique • Triade : Pâleur / Splénomégalie / Ictère • Lithiase biliaire • Urines foncées, selles non décolorées (sauf complication biliaire intercurrente)

Cependant, la recherche d'un déficit en PK n'est pas réalisée en première intention. Il n'est évoqué en premier lieu que dans le cadre d'une histoire familiale. Dans les autres cas, les causes plus fréquentes d'hémolyses devront être écartées au préalable.

Deux cadres étiologiques se distinguent : l'hémolyse d'origine extracorpusculaire et l'hémolyse intracorpusculaire (voir *Figure 13*). Un déficit en PK peut être suspecté lorsque que le test de Coombs (ou test direct à l'antiglobuline, TDA) est négatif et que les hématies ne présentent pas d'anomalies morphologiques sur le frottis.

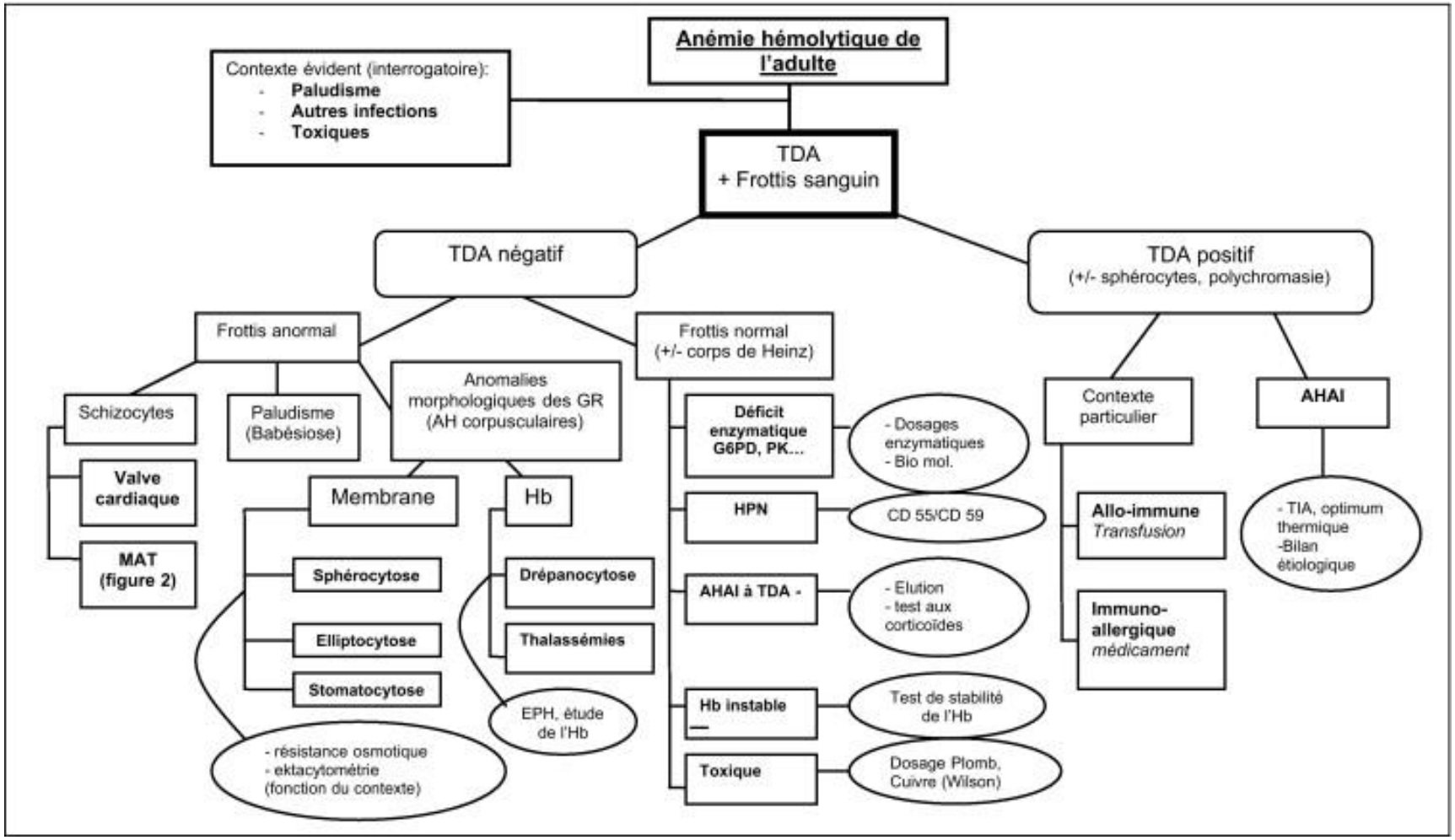


Figure 13– *Démarche diagnostique devant une anémie hémolytique*

(source : Loustau V, et al. *La Presse Médicale*. 2011 (60))

1.3.3. Examens de biologie spécialisée

Le dépistage du déficit en PK repose sur la mesure d'activité enzymatique. En cas d'activité abaissée, les mutations de PKLR sont ensuite objectivées par séquençage.

1.3.3.1. Mesure de l'activité enzymatique de la PK

Le principe général de la méthode est identique pour la détermination des activités de toutes les enzymes érythrocytaires.

La méthode de mesure a été décrite par E. Beutler en 1971 , et reconnue comme étant la méthode de référence par un comité international de standardisation des méthodes en hématologie (*International Committee for Standardization in Haematology, 1977*) (61).

1.3.3.1.1. Problématique principale et limite de la méthode

L'activité des enzymes du globule rouge ne sont pas constantes et décroissent au cours de la vie de l'hématie (62). En effet, les hématies les plus âgées engagent deux fois moins de glucose dans la voie d'Embden –Meyerhof que les globules rouges matures. En parallèle, la quantité d'ATP intraérythrocytaire diminue avec le vieillissement de l'hématie (63).

En l'absence d'organites, celui-ci n'est pas doué de synthèse protéique et, au cours de ses 120 jours de vie dans des conditions physiologiques, le globule rouge mature doit fonctionner avec le stock enzymatique dont il est pourvu initialement.

Ainsi, la mesure de l'activité des enzymes érythrocytaires n'est que le moyennage des activités d'un ensemble d'hématies d'âges très divers et dont les activités individuelles sont très variables, élevées dans les hématies les plus jeunes, plus basses dans les hématies les plus sénescentes.

Au cours du déficit en PK, une hémolyse constante déplace l'âge médian des hématies vers des valeurs faibles en raison de l'érythropoïèse intense, et par conséquent, l'activité globale mesurée, est majorée par l'excès de cellules jeunes. Le risque est donc d'une part de sous-estimer un déficit en PK, par mesure d'une activité faussement élevée, mais surtout de le méconnaître, par estimation d'une activité faussement normale.

La *Figure 14* schématise la correspondance entre âge médian des hématies et activité enzymatique mesurée.

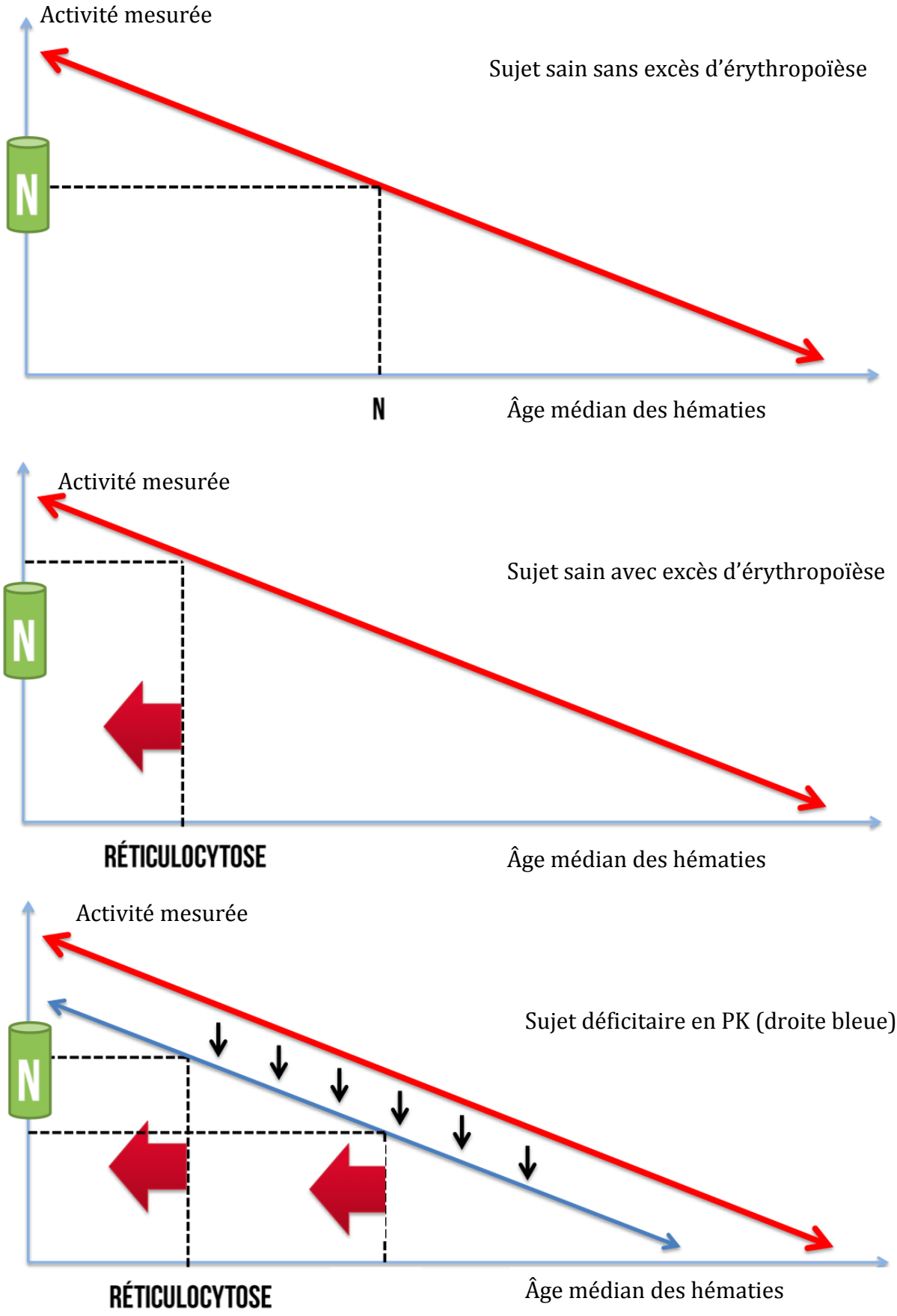


Figure 14 – *Impact de l'âge médian des hématies sur la mesure d'activité de la PK*
(l'intervalle de normalité d'activité est matérialisé par le cylindre vert "N")

Ainsi, l'activité de la PK ne doit être interprétée que par rapport aux activités d'autres enzymes du globule rouge servant de « témoin interne », car mesurées sur un pool d'hématies du cas index, et dont l'âge médian est identique.

Deux autres enzymes sont couramment utilisées pour interpréter l'activité de la PK :

- La G6PD n'est pas un témoin idéal :
    - Le déficit est fréquent et peut être combiné à un déficit en PK
    - La transmission est liée à l'X et la mesure peut être faussée par le phénomène de lyonnisation
- L'hexokinase est le témoin retenu par le CNR Mondor :
    - Le déficit en HK est extrémement rare (voir *Figure 10*) et sa transmission n'est pas liée à l'X

1.3.3.1.2. Principe de la méthode (61,64,65)

1.3.3.1.2.1. Prélèvement et conservation de l'échantillon

Un volume minimal de 4 mL de sang est prélevé sur un tube contenant un anticoagulant :

- Les tubes à ACD-B ont démontré une meilleure conservation des différentes enzymes.
- Cependant un tube EDTA peut être utilisé

Dans l'idéal, l'échantillon sous forme de sang total doit transiter à 4-5°C (et non à une température inférieure pour éviter l'hémolyse) du lieu du prélèvement au site analytique où il doit ensuite être maintenu à 4 °C.

A cette température, l'activité de toutes les enzymes érythrocytaires est relativement stable pendant au moins 6 jours. Dans le cas de la PK, de la G6PD et de l'hexokinase, le prétraitement et le dosage, s'il est réalisé dans les 20 jours après prélèvement et conservation à 4°C (voir *Tableau 4*), garantit une perte d'activité inférieure à 10%. Cependant, l'idéal est de réaliser le prétraitement et la mesure le plus rapidement possible après prélèvement.

Tableau 4 - *Stabilité des enzymes en fonction du milieu de stockage et de la température*
(D'après Beutler E., *Grune & Stratton*, 1971(64))

	4°C		**25°C**	
	Tube ACD	**Tube EDTA**	**Tube ACD**	**Tube EDTA**
Pyruvate kinase	20 jours	20 jours	5 jours	5 jours
G6PD	20 jours	20 jours	5 jours	5 jours
Hexokinase	20 jours	20 jours	5 jours	5 jours

1.3.3.1.2.2. Pré-traitement de l'échantillon : préparation d'un hémolysat

Cette étape est particulièrement sensible. En effet, il faut éliminer les leucocytes et ne garder qu'un culot globulaire. L'activité de la PK d'un leucocyte est non-seulement trois cent fois plus élevée que celle d'un érythrocyte, mais est assurée par une isoenzyme PKM, qui n'est pas codée par *PKLR*, donc non-mutée. La présence de leucocytes augmenterait considérablement l'activité mesurée.

La déleucocytation est obtenue par filtration sur colonne de cellulose (66,67). Le sang total est filtré à travers une petite colonne (seringue de 10cc dont on a retiré le piston) renfermant un mélange de cellulose microcristalline (Sigma-Aldrich®) et d'α-cellulose (Sigma-Aldrich®).

Le culot érythrocytaire est ensuite lavé trois fois par une solution isotonique de NaCl. L'hémolysat est préparé dans une solution hypotonique et stabilisante (renfermant de l'EDTA neutralisé, et du β-mercaptoéthanol).

Après hémolyse, les enzymes ne conservent leur activité à 0 °C que pendant quelques heures. Si le dosage (ou la caractérisation) de l'enzyme doit être longtemps différé, on peut conserver à -80 °C ou dans l'azote liquide les globules rouges déleucocytés, lavés et congelés en bille, à condition de procéder au dosage (ou à la caractérisation) immédiatement après la décongélation. La congélation du sang total est absolument prohibée, puisqu'elle entraîne l'hémolyse et le mélange avec le plasma lors de la décongélation.

1.3.3.1.2.3. Phase analytique : dosage de l'activité

Etape 1 : mesure de la concentration en hémoglobine de l'hémolysat

La méthode de Drabkin est utilisée : mesure spectrophotométrique à 540nm. Un volume d'hémolysat est mélangé avec la solution de Drabkin.

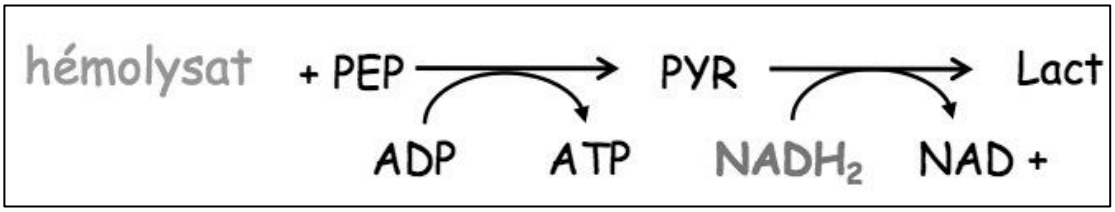
Le taux d'hémoglobine de l'hémolysat est calculé de la façon suivante :

$$\frac{DO\ mesurée\ \text{à}\ 540nm \times volume\ total \times facteur\ de\ calibration\ Hb}{Volume\ d'hémolysat} = Hb\ (\frac{g}{dL})$$

Etape 2 : Mesure de l'activité de la PK

La PK catalyse le transfert d'une liaison riche en énergie du PEP sur l'ADP avec formation d'ATP et de pyruvate. Puis le pyruvate est réduit en lactate par la LDH avec production de NAD. Tous les réactifs sont placés dans une cuvette de spectrophotomètre, y compris les ions Mg2+ et K+, nécessaires à l'activité de la PK, de l'ADP et du NADH. Le PEP est à concentration saturante : l'allostérie n'est donc pas prise en compte.

La formation du NAD est suivie à 340 nm en spectrophotométrie. Un témoin sans hémolysat doit être réalisé pour vérifier l'absence de contamination par la PK de la LDH utilisée.



Le spectromètre doit être thermostaté. En effet, l'activité mesurée varie en fonction de la température d'essai et des facteurs de correction doivent être appliqués en fonction de la température choisie.

$$\frac{\Delta \text{DO}\ 340\text{nm} \times \text{Volume total} \times facteur\ de\ calibration}{Volume\ d'hémolysat} = activité\ en\ U/mL$$

Les résultats sont ensuite exprimés en U/g d'hémoglobine. Chaque laboratoire doit définir ses propres normes, en fonction des conditions expérimentales.

Dans les conditions définies par le comité de standardisation, les valeurs usuelles sont de 13 à 17 IU/gHb.

1.3.3.1.2.4. Phase post-analytique : interprétation des résultats

Les résultats ne peuvent être interprétés qu'en l'absence de transfusion de moins de 3 mois. Il faut donc absolument prélever les échantillons, en vue de la recherche d'un déficit en PK avant toute transfusion, notamment chez le nouveau-né.

Deux paramètres influent sur le niveau d'activité mesurée de l'enzyme :

- L'âge du patient (les nouveau-nés ayant une activité plus élevée que les adultes)
- Le taux de réticulocytes qui ont tendance à augmenter l'activité s'ils sont élevés

Chez le déficitaire en PK homozygote ou hétérozygote composite pour des mutations de *PKLR*, l'activité est très variable (10 à 50 %). Plus le taux est effondré, plus le diagnostic est évident.

Néanmoins, l'activité résiduelle est souvent relativement importante et il est difficile de conclure. C'est dans cette situation, surtout si le taux de réticulocytes est important, que le recours à d'autres dosages enzymatiques est intéressant (préférentiellement l'hexokinase). L'activité peut être aussi comparée à celle d'un témoin d'âge proche ayant un taux de réticulocytes similaire.

1.3.3.1.3. Situations particulières (65)

- Un déficit acquis en pyruvate kinase peut être observée dans certaines hémopathies acquises (anémies réfractaires, dysérythropoïèses, leucémies aiguës granulocytaires), et au cours de l'hémochromatose.
- Une hyperactivité de la pyruvate kinase accompagnée d'une élévation de l'ATP et d'une diminution du 2,3-BPG et aussi, parfois, d'une polyglobulie signent l'expression de PK-M2

1.3.4. Etude génotypique de *PKLR*

1.3.4.1. A propos de PKLR

Situé sur le bras long du chromosome, 1q21 (68,69), le gène *PKLR* code pour les isoenzymes humaines hépatiques (PK-L) et érythrocytaires (PK-R) de la PK. *PKLR* est doté de promoteurs alternatifs (22,70) qui orientent vers l'expression de PK-R ou PK-L spécifiquement en fonction du tissu (71,72).

La région codante de ce gène comprend plus de 2060 paires de bases (pb), et est divisée en 12 exons, dont 10 sont communs à PK-L et PK-R. Les exons 1 et 2 sont respectivement spécifiques des isoenzymes érythrocytaires et hépatiques. L'ARNm de l'isoenzyme PK-R mesure 2 kb et code pour une protéine de 574 acides aminés.

Le promoteur a été identifié à l'extrémité 5', formé par 270 paires de bases (pb) en amont du codon d'initiation de la transcription, et comprend deux boîtes CAC et quatre motifs GATA. Deux séquences de la région promotrice sont distinguées :

- Les 120pb les plus proximales ont une fonction de promoteur basique
- Les 150pb les plus distales composent un puissant activateur dans les cellules de la lignée érythrocytaire.

Les mutations et polymorphismes de *PKLR* sont numérotés à partir du A (+1) du codon ATG d'initiation (position 40 sur la séquence de référence GENBANK D13026) (73).

Au moins 6 polymorphismes de *PKLR* sont décrits (*Tableau 5*).

Tableau 5 – *Polymorphismes du gène PKLR*

Polymorphisme (ADNc)	**ADN génomique**	**Exon**	**Référence**
Ivs5(+51)c/t	2838 C/T	Ivs5	(74,75)
$T_{10/19}$	5972-5981 (T_{10})	Ivs11	(72)
Microsatellite ATT	7181-7222	Ivs12	(76)
1705 A/C	7619 A/C	Exon 12	(77)
1738 C/T	7652 C/T	Exon 12	(75)
1992 C/T	7906 C/T	Exon 12	(72)

L'ADN est isolé par des méthodes standards. Tous les exons de *PKLR*, les régions introniques flanquées aux exons, et le promoteur spécifique de PK-R sont amplifiés par PCR.

Les amplifiats sont ensuite séquencés.

1.3.4.2. Mutations de PKLR

223 mutations distinctes de *PKLR* (voir *Annexe 2*) ont été publiées à la date du 1er novembre 2013, et compilées dans les bases de données (Europe, Amérique du Nord, et Asie principalement). La nature de ces mutations est présentée sur la *Figure 15*.

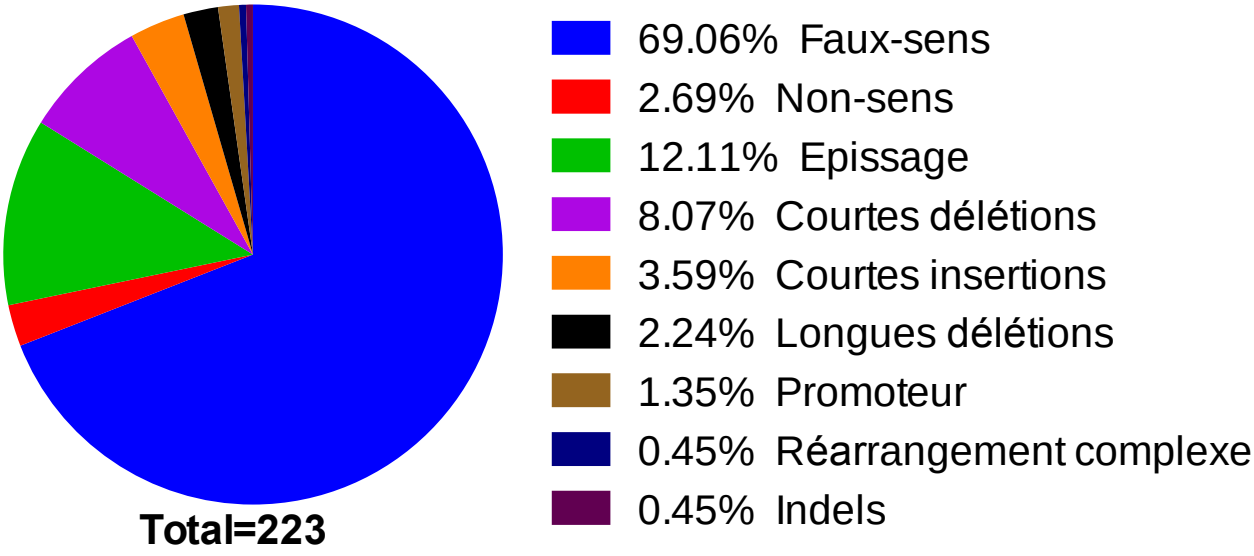


Figure 15 – *Nature des 223 mutations de PKLR actuellement recensées*
(d'après la base de données "*The Human Gene Mutation Database* ", Biobase, 2013 (78))

La *Figure 16* présente une topographie (non-exhaustive) des mutations de *PKLR*.

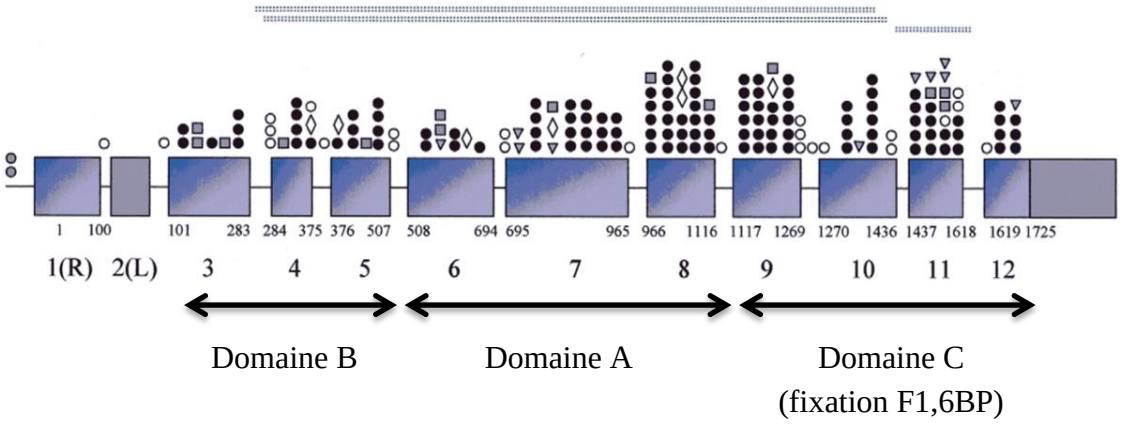


Figure 16 – *Topographie des mutations de PKLR (non-exhaustive)*
Les nucléotides numérotés à partir du codon ATG de l'exon 1, spécifique de la lignée érythrocytaire. ●=mutation du promoteur, ○=mutation d'un site d'épissage, ●=mutation faux-sens, ■= mutation frameshift, ◇=insertion/délétion, ▽= non-sens, ┈=délétions larges
(d'après: A. Zanella et al., Blood Reviews, 2007 (79))

La *Figure 17* présente la séquence protéique de *PK-R*.

```
        10          20          30          40          50          60
MSIQENISSL QLRSWVSKSQ RDLAKSILIG APGGPAGYLR RASVAQLTQE LGTAFFQQQQ

        70          80          90         100         110         120
LPAAMADTFL EHLCLLDIDS EPVAARSTSI IATIGPASRS VERLKEMIKA GMNIARLNFS

       130         140         150         160         170         180
HGSHEYHAES IANVREAVES FAGSPLSYRP VAIALDTKGP EIRTGILQGG PESEVELVKG

       190         200         210         220         230         240
SQVLVTVDPA FRTRGNANTV WVDYPNIVRV VPVGGRIYID DGLISLVVQK IGPEGLVTQV

       250         260         270         280         290         300
ENGGVLGSRK GVNLPGAQVD LPGLSEQDVR DLRFGVEHGV DIVFASFVRK ASDVAAVRAA

       310         320         330         340         350         360
LGPEGHGIKI ISKIENHEGV KRFDEILEVS DGIMVARGDL GIEIPAEKVF LAQKMMIGRC

       370         380         390         400         410         420
NLAGKPVVCA TQMLESMITK PRPTRAETSD VANAVLDGAD CIMLSGETAK GNFPVEAVKM

       430         440         450         460         470         480
QHAIAREAEA AVYHRQLFEE LRRAAPLSRD PTEVTAIGAV EAAFKCCAAA IIVLTTTGRS

       490         500         510         520         530         540
AQLLSRYRPR AAVIAVTRSA QAARQVHLCR GVFPLLYREP PEAIWADDVD RRVQFGIESG

       550         560         570
KLRGFLRVGD LVIVVTGWRP GSGYTNIMRV LSIS
```

Figure 17 – *Séquence protéique de PK-R*

(NCBI Reference Sequence: NP_000289.1)

PARTIE 2 : Présentation de trois observations détaillées de patients déficitaires en PK

Dans cette seconde partie, nous présentons 3 observations détaillées de patients défitaires en PK. La complexité de ces 3 cas, a motivé la constitution d'une cohorte nationale descriptive et ces patients font partie de l'effectif de l'étude présentée en *Partie 3*.

- Le cas du patient Bd09 illustre la potentielle gravité du déficit en PK
- L'observation du patient Bd04 permet d'exposer une forme sévère de déficit en PK, avec un bénéfice important apporté par la splénectomie, puis un succès de chélation médicamenteuse par Exjade®
- Finalement, nous présenterons le dossier de la Famille R., dont deux membres (les sœurs Bd10 et Bd11) sont déficitaires en PK. Cette observation permet de souligner la variabilité de l'expression phénotypique intrafamiliale caractéristique du déficit en PK, et l'importance du génotypage en vue d'un conseil génétique

2.1. Observation n°1 : patient Bd09

- Naissance le 07/01/2011 par césarienne en urgence à 37 semaines d'aménorrhée pour souffrance foetale aiguë dépistée lors d'une visite systématique
- Il s'agissait d'une seconde grossesse d'une mère de 31 ans, de groupe sanguin O+, sans anomalie au cours du suivi. Les parents sont caucasiens, non-consanguins.
- APGAR à 2/10 et détresse respiratoire : prise en charge en réanimation, intubation-ventilation
- On notait une volumineuse hépatosplénomégalie associée à des adénopathies axillaires et inguinales, ainsi qu'un pneumothorax
- Le bilan biologique retrouvait :
    - Hémoglobine=5,1g/dL, VGM=142,4fl, CCMH=29,8g/dL,
    - L'absence d'anomalie qualitative sur les frottis sanguins
    - Réticulocytes=321G/L
    - Leucocytes=21G/L, Plaquettes=70G/L
    - Bilirubine = 212 µmol/L (dont libre = 138 µmol/L, conjuguée = 74 µmol/l)
    - Bilan hépatique : ASAT=45U/L, TP=15%, facteur V=97%
    - L'absence d'allo-immunisation fœto-maternelle a été vérifiée
- Une transfusion de concentrés globulaires a été immédiatement prescrite puis renouvelée à plusieurs reprises
- La période néonatale s'est ensuite bien déroulée en sortie de réanimation à 5 jours de vie
- A 6 mois de vie, l'hémoglobine était à 6g/dL avec des réticulocytes peu élevés à 20G/L sous régime transfusionnel régulier (une séance toutes les trois semaines), la ferritinémie plafonnait à 1025 ng/mL. Devant cette anémie arégénérative, une étude médullaire a été réalisée.
- A ce stade, après constat d'une dysérythropoïèse intense sur le myélogramme (érythroblastes binucléés, dysmorphie cytoplasmique, images de caryorrhexis, voir *Figure 18*), le diagnostic de **dysérythropoïèse congénitale** a été suspectée (voir frottis médullaires)
- Cependant, la recherche de mutation dans les séquences flanquantes et codantes des gènes CDA et Sec23B, codant pour les protéines codanine et Sec23B, témoignant respectivement d'une dysérythropoïèse congénitale de type I ou II était négative Des
- PCR sanguines et médullaires ont éliminé une infection à CMV, HSV6, adénovirus et parvovirus B19

- C’est à l’âge de 17 mois, qu’un déficit d’activité de la PK a été objectivé chez cet enfant, porteur d’une hétérozygotie composites pour des mutations des exons 7 et 8 du gène PKLR, retrouvées à l’état hétérozygote chez ses parents :
    - p.Arg289Trp, exon 7, également retrouvée chez le père
    - p.Asp339Gly, exon 8, également retrouvée chez la mère
- Les transfusions répétées de culots globulaires avaient compromis l’étude enzymatique, qui n’a été réalisée que chez les parents : les activités PK étaient diminuées, et les activités HK étaient augmentées
- Un traitement chélateur par Exjade® a été débuté à l’âge de 2 ans à 20 mg/kg/jour, et la ferritine reste stable à 450ng/mL (contre 800ng/mL avant traitement).
- Une splénectomie partielle a été réalisée en octobre 2013 à l’âge de 34 mois devant des besoins transfusionnels toujours élevés. Au moment de l’impression de ce document (novembre 2013), le bénéfice apporté par cette intervention était relatif (Hb=6 g/dL), et devra être évalué à plus long terme.

Ce cas est intéressant puisqu’il témoigne, non-seulement de la sévérité potentielle du déficit en PK, mais qu’il expose aussi la difficulté du diagnostic, devant des signes cliniques et biologiques sans spécificité, et peu orientants.

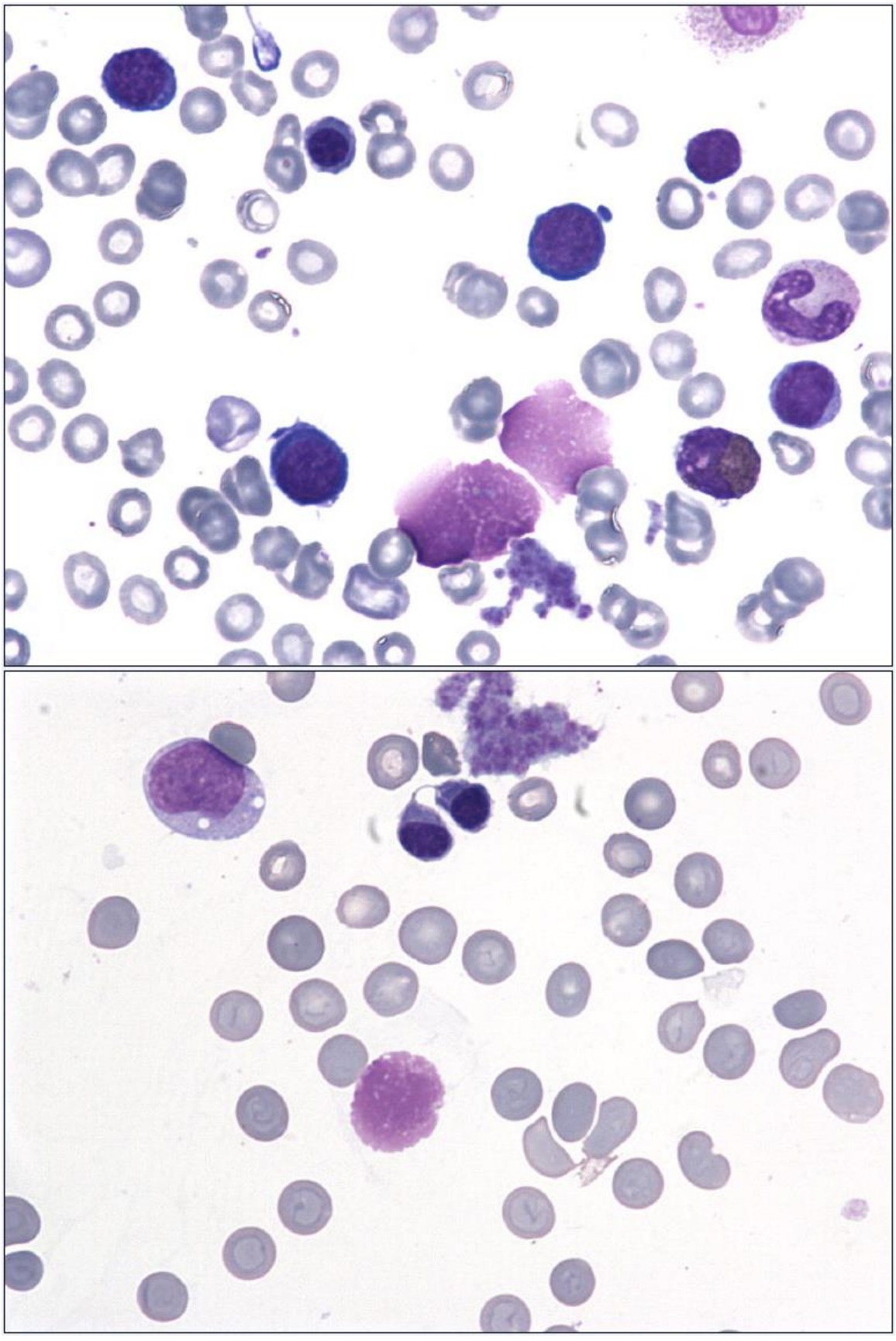


Figure 18 – *Frottis de moelle osseuse du patient Bd09 au microscope optique*
(Grossissement x50, coloration May-Grünwald-Giemsa)

2.2. Observation n°2 : patient Bd04

- Naissance le 20/12/1980 par accouchement voie basse à terme, dans le tableau clinique suivant :
    - Ictère cutanéo-muqueux d'intensité modérée
    - Ecchymoses multiples et purpura pétéchial
    - Hépatosplénomégalie
    - Hypotonie
- Biologie à la naissance :
    - Anémie, hémoglobine=5,6 g/dL
    - Thrombopénie, 75G/L
    - Bilirubinémie=136 µmol/L (dont, bilirubine non-conjuguée, 85 µmol/L)
- Le patient a bénéficié d'une exsanguinotransfusion à la 6ème heure de vie
- Devant ce tableau une infection néonatale à streptocoque B (retrouvé sur le placenta) est évoquée en premier lieu et prise en charge par une antibiothérapie
- Cependant la persistance de cette anémie avec un caractère hémolytique et nécessitant des transfusions a conduit à une exploration à 1 an :
    - Hb=6 g/dL, VGM=95 fl, 300 G/L de réticulocytes, haptoglobine effondrée
    - Normalisation de la numération plaquettaire (355 G/L)
- Les examens suivants étaient normaux :
    - Test direct à l'antiglobuline (TDA, ou test de Coombs) et recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) pour exclusion d'une allo-immunisation foeto-maternelle
    - Test de résistance osmotique poir élimination d'une pathologie membranaire
    - Electrophorèse de l'hémoglobine et test de falciformation pour exclusion d'une hémoglobinopathie
- Le myélogramme confirme une réaction érythroblastique (65%)
- Les résultats des mesures d'activités enzymatiques étaient les suivants:

Tableau 6 – *Activités enzymatiques mesurées pour Bd04*

	G6PD **(U/mL)**	PK **(U/mL)**	Date dernière transfusion
Laboratoire 1 (CH)	↗5,12 (N=2,2-3,9)	↗6,5 (N=1,5-2,5)	- 1 mois
Laboratoire 2 (CHU)	↘1258 (Témoin=1300)	↘640 (Témoin=680)	- 1 mois
Laboratoire 3 (CHU référent)	↗1,68 (N=1,35-1,82)	↘0,809 (N=3,08-4,08)	-2 mois

Le laboratoire 3 est reconnu pour sa compétence en mesure d'activité des enzymes intraérythrocytaires, et un déficit en PK est mis en évidence avec un profil associant une activité PK effondrée et une activité G6PD augmentée.

Les parents et la demi-sœur du cas index étaient asymptomatiques et ont un taux d'hémoglobine normal. Nous présentons en *Figure 19* l'arbre généalogique de Bd04.

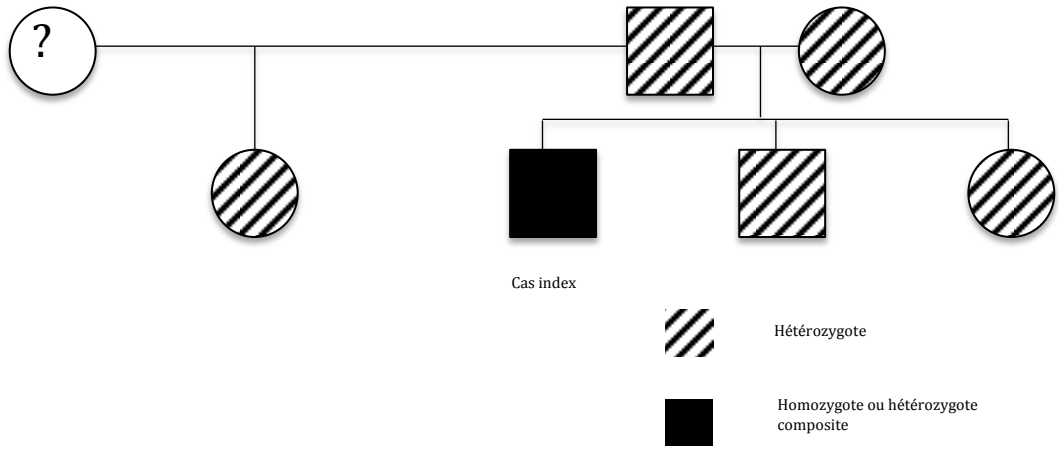


Figure 19 – *Arbre généalogique de Bd04*

En effet, les activités enzymatiques, mesurée par le Laboratoire 3, sont les suivantes (*Tableau7)* :

Tableau 7 – *Activités enzymatiques mesurées pour la famille de Bd04*

	G6PD **(U/mL)**	PK **(U/mL)**
Père	↗3,12 (N=1,35-1,82)	↘2,88 (N=3,08-4,08)
Mère	↗4,14 (N=1,35-1,82)	↘1,37 (N=3,08-4,08)
Frère	↗3,9 (N=1,35-1,82)	↘2,4 (N=3,08-4,08)
Soeur	↗4,03 (N=1,35-1,82)	↘2,7 (N=3,08-4,08)
Demi-sœur **(fille du père)**	↗4,05 (N=1,35-1,82)	↘1,37 (N=3,08-4,08)

Ces activités PK abaissées (environ -30% de la normale) sont en faveur d'une mutation de *PKLR* à l'état hétérozygote.

Dans les 10,5 premières années de vie, la prise en charge a reposé sur un régime transfusionnel régulier, 55 séances avec un seuil de tolérance entre 7 et 8 g/dl d'hémoglobine :

- 1 séance/2,6 mois pendant les 9 premières années (82 cc/mois)
- 1 séance/1,2 mois la dixième année (370 cc/mois)

Une splénectomie a été réalisée à 10,5 ans dans le contexte suivant :

- Augmentation des besoins transfusionnels
- Ferritinémie à 1600 ng/ml (malgré une chélation par Desféral®)
- Lithiase biliaire symptomatique : cholécystectomie à froid dans le même temps opératoire

A distance de la splénectomie :

- Hb stabilisée à 7,5 g/dL
- Réticulocytose à 1500 G/L

Plus récemment, à l'occasion d'un conseil génétique en vue d'une paternité, un génotypage a montré une hétérozygotie composite pour des mutations de *PKLR*, retrouvées chez les parents à l'état hétérozygote :

- p.Tyr408Ile, exon 9
- p.Arg510Gln, exon 11

Actuellement, à l'âge de 33 ans, ce patient a une activité professionnelle normale :

- Le régime transfusionnel est interrompu depuis la splénectomie. Dans cette observation, le bénéfice de cette splénectomie est indiscutable dans ce cas extrêmement sévère initialement
- Hb à 7,4 g/dL et réticulocytes=240 G/L
- La surcharge martiale est parfaitement maîtrisée sous chélation par Exjade® débutée en 2009 à la dose de 25mg/kg/jour, monitorée par dosage des taux résiduels avec un seuil à 5µg/mL (méthode mise au point au Laboratoire de Pharmacologie du Pr M. MOLIMARD, CHU de Bordeaux) et interrompue début 2013, devant la dispariation de la surcharge martiale (voir *Figure 20*).

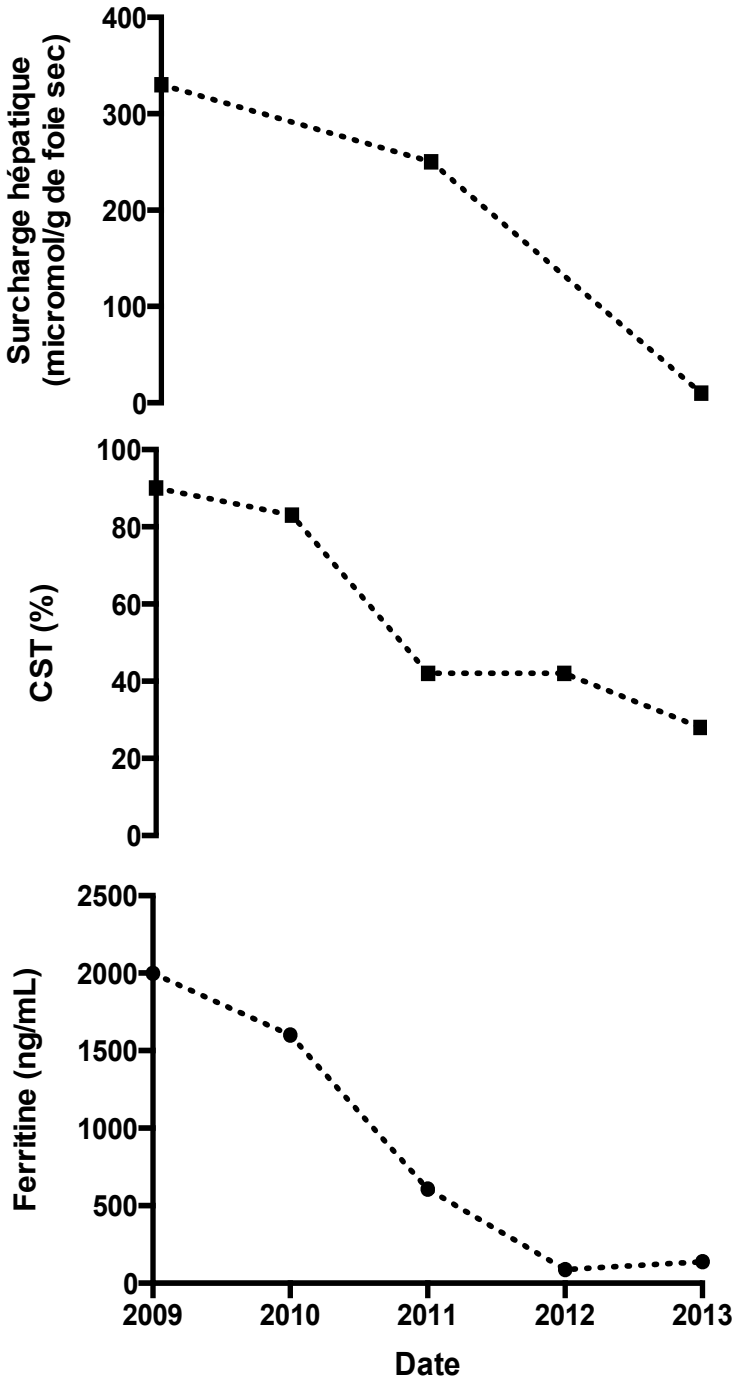


Figure 20 – *Evolution de la surcharge martiale de Bd04 sous chélation médicamenteuse par Exjade® depuis 2009*
(NB : le premier point, 2009, est antérieur au début du traitement)

2.3. Observation n°3 : sœurs Bd10 et Bd11

Dans cette observation, nous présentons l'arbre génalogique de la famille R : les soeurs Bd10, et Bd11 et leur frère, dont les parents ne sont pas consanguins et d'origine italienne.

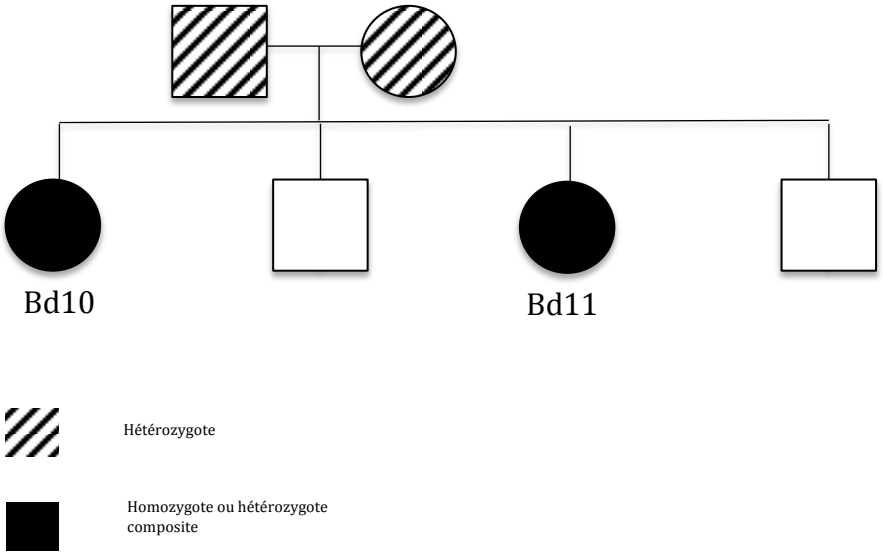


Figure 21 – *Arbre généalogique de la Famille R.*

- **1ère naissance, Bd10 :**
    - Née à terme le 26/09/2000 par voie basse après une grossesse normale, et a présenté un ictère néonatal précoce au 1er jour de vie associé à une anémie hémolytique (Hb = 9,6 g/dl, réticulocytes = 778 G/L, bilirubine totale 150 µmol/L, dont bilirubine non-conjuguée = 9µmol/L).
    - 3ème jour de vie : a bénéficié d'une première transfusion
    - 6 mois de vie :
        - Présente une splénomégalie.
        - Bilan biologique : Hb = 5,4 g/dl, réticulocytes = 218 G/L, haptoglobine effondrée, hématies de morphologie normale sur le frottis.

- Mesures d'activités enzymatiques :

Tableau 8 – *Activités enzymatiques mesurées pour Bd10 et ses parents*

	G6PD (mU/10^{9}GR)	**PK Labo1 (mU/10^{9}GR)**	**PK Labo2 (U/gHb)**
Bd10 (à distance des transfusions)	165 (Témoin=138)	320 (Témoin=275)	4 (N=5.9-8.1)
Père	118 (Témoin=162)	142 (Témoin=364)	2 (N=5.9-8.1)
Mère	122 (Témoin=162)	165 (Témoin=138)	3 (N=5.9-8.1)

- Génotypage *PKLR*, pas de preuve génétique formelle de déficit en PK :
  - Bd10 : hétérozygote pour la mutation paternelle
  - Mère : aucune anomalie de séquence identifiée
  - Père : hétérozygote pour une mutation de l'intron 9

- Evolution :
  - Poursuite d'un régime transfusionnel régulier (1 séance toutes les 6 semaines)
  - Splénectomie à l'âge de 8 ans permettant d'interrompre le régime transfusionnel, associée à une cholécystectomie
  - Surcharge ferrique hépatique sévère sous traitement chélateur par Desferal®, 200 µmol/g de foie sec (IRM, normale<36), relayé par Exjade®.

Absence de conseil génétique en l'absence d'identification d'une seconde mutation de *PKLR* (qui serait d'origine maternelle) pour les 2 grossesses suivantes.

- **2ème naissance, frère :**
  - Grossesse et accouchement normaux, eutrophe
  - Ni ictère néonatal, ni anémie hémolytique
  - Recherche de déficit en PK négative

- **3ème naissance, Bd11 :**
    - Accouchement à terme, à domicile non médicalisé, le 16/12/2007
    - Apgar 9/10 puis 5/10 et détresse respiratoire, avec pneumothorax
    - On constate d'emblée une anémie néonatale hémolytique sévère (Hb = 5,1 g/dl) associée à une hépatosplénomégalie avec insuffisance hépatocellulaire (TP 45%, ASAT = 315 UI/L, ALAT = 102 UI/L)
    - Transfusion de culot globulaire, mesures de réanimation et transfert en CHU
    - L'analyse génétique est reprise, et une délétion est mise en évidence dans l'exon 4 du gène *PKLR* retrouvée chez la mère, Bd10 et Bd11
    - L'évolution clinique est ensuite défavorable jusqu'au décès à 3 mois de vie dans un tableau d'hépatosplénomégalie avec ascite, insuffisance cardiaque et poursuite d'hémolyse (ce dossier sera discuté ultérieurement en Partie 3 pages 124 et 125).

Au total, Bd10 et Bd11 étaient hétérozygotes composites pour des mutations de *PKLR* :

- p.Ala110FS, exon 4
- ivs 9 c.1269 +5G>A

- **4ème naissance : Enfant ne présentant pas de mutation de *PKLR*…**

Cette observation illustre :

- La variabilité intrafamiliale de la sévérité du phénotype pour un même génotype
- L'importance du génotypage qui permet le conseil génétique
- L'utilité d'un suivi renforcé au 3 ème trimestre de grossesse
- La nécessité d'une prise en charge précoce à l'accouchement (éventuelle réanimation)

PARTIE 3 : « CODE PK », présentation des résultats de l'étude de 60 patients deficitaires en pyruvate kinase intraérythrocytaire

Le déficit en PK intraérythrocytaire est une pathologie congénitale rare et cosmopolite, à l'origine d'une hémolyse chronique. Nous exposons dans cette seconde partie les résultats de notre étude, visant à recenser et décrire les patients déficitaires.

3.1. « CODE PK » : présentation de l'étude et de sa méthodologie

3.1.1. Initiative et objectifs

Cette étude descriptive, nommée « Code PK », pour « Cohorte de patients Déficitaires en Pyruvate Kinase » est le fruit des échanges entre des médecins des centres de référence et de compétence sur les Maladies Constitutionnelles du Globule Rouge et de l'Erythropoïèse (MCGRE). Elle implique particulièrement les CHU de Bordeaux, Henri Mondor (Créteil) et de la Timone (Marseille).

L'idée première est de recenser et de décrire les patients déficitaires en pyruvate kinase suivis dans les centres de référence et de compétence sur les MCGRE du territoire français.

Les objectifs de cette étude sont multiples :

- L'objectif principal est d'obtenir des données épidémiologiques nationales sur la pathologie, en particulier sur sa morbidité et à plus long terme sur sa mortalité
- Corréler le phénotype au génotype
- Etudier les stratégies thérapeutiques conventionnelles et innovantes
- Evaluer la surcharge martiale et sa prise en charge
- Finalement, ce travail a pour finalité la création ultérieure d'un registre

3.1.2. Méthodologie

Une fiche de renseignements (présentée en *Annexe 3*) a été conçue de façon collective en se fondant sur les données de la littérature, mais aussi à partir des questions soulevées par les membres du groupe de travail (Dr M. MICHEAU, Dr I. THURET, Dr S. PISSARD, O. LACRAMPE). Cette fiche de 4 pages contient des informations démographiques, cliniques, biologiques, génétiques et thérapeutiques. Ce document a évolué au fil des inclusions pour être le plus exhaustif et précis possible.

Afin d'initier l'inclusion des patients, nous avons opté pour un premier recrutement oligocentrique à partir des fichiers du Centre National de Référence sur les enzymopathies du globule rouge au CHU Henri Mondor (Dr PISSARD) et de l'unité de pathologie moléculaire du globule rouge de Lyon (Dr JOLY). Ces laboratoires réalisent la quasi-totalité des génotypages de *PKLR* en France.

En effet, seuls les patients vivants, ou décédés, ayant bénéficié d'un génotypage de *PKLR* retrouvant des mutations à l'état homozygote ou hétérozygote composite peuvent être inclus. Dans un premier temps, l'étude préliminaire a été oligocentrique et principalement descriptive.

Cette liste fournie par les laboratoires de Créteil et de Lyon ne permet que d'amorcer le recrutement puisque que seuls les patients génotypés sont connus de ces deux laboratoires. Dans cette optique, des fiches de renseignement ont été distribuées aux cliniciens en charge de patients déjà connus des laboratoires ou nouvellement diagnostiqués

Les données ont été collectées de façon rétrospective du 1er janvier 2013 au 1er juin 2013 et retranscrites sur les fiches d'inclusion.

A réception, les informations recueillies sont compilées dans un fichier de données au format Epi Info 7™, logiciel gratuit édité par le CDC et permettant le traitement de bases de données épidémiologiques.

Les patients ont été ensuite inclus dans des groupes en fonction de la sévérité phénotypique, qui sont définis comme suit :

- **Déficit sévère :**
  - Taux d'hémoglobine inférieur à 8 g/dL
  - Et/ou Patient splénectomisé
  - Et/ou régime transfusionnel en cours
- **Déficit modéré :**
  - Taux d'hémoglobine compris entre 8 et 10 g/dL
  - Et/ou support transfusionnel ponctuel
  - Et absence de splénectomie
- **Déficit mineur :**
  - Taux d'hémoglobine supérieur à 10 g/dL
  - Et aucune transfusion
  - Et absence de splénectomie

3.1.3. – Aspects réglementaires

D'un point de vue éthique, l'ensemble des patients inclus, ou leur représentant légal, ont signé un consentement libre et éclairé avant exploitation du matériel génétique à des fins diagnostiques et scientifiques. Ils ont également consenti à l'usage des données biologiques et cliniques.

3.2 – CODE PK : présentation des résultats

3.2.1. Démographie de la cohorte

Nous avons collecté des données pour 64 patients homozygotes ou hétérozygotes composites pour des mutations de *PKLR*, issus de 17 centres de France métropolitaine (*Tableau 9*). Nous ne disposons pas de données exhaustives pour chacun des cas rapportés, et lors de l'exploitation des données, nous précisons l'effectif afin de pondérer chaque information. Nous avons ultérieurement exclu 4 patients dont le génotype n'a pas été communiqué.

Tableau 9 – *Centres d'inclusion de l'étude CODE PK (au 1er juin 2013)*

Centre / Hôpital	**n**	**Proportion dans la population de l'étude**
CHU Henri Mondor - AP-HP (Créteil), Unité des Maladies Génétiques du Globule Rouge, Centre de référence (Pr F. GALACTEROS)	16	25,4%
CHU de Bordeaux, Centre de compétence pédiatrique et pour adultes d'Aquitaine (Dr M. MICHEAU)	11	15,9%
Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, Université catholique de Lille, Centre de compétence pédiatrique et pour adultes Nord (Pr C. ROSE)	6	6,4%
Hôpital d'enfants de la Timone - AP-HM (Marseille), Centre de référence (Dr I. THURET)	8	12,7%
CHU de Rouen, Centre de compétence pédiatrique et pour adultes Haute-Normandie, Picardie et Basse-Normandie (Pr JP. VANNIER et Dr A. LAHARY)	6	9,5%
CHU de Dijon, Centre de compétence pédiatrique et pour adultes Bourgogne et Moselle (Dr G. COUILLAULT)	3	4,8%
CHU Lyon Sud, Service d'hématologie clinique (Pr G. SALLES)	3	4,8%
CHRU de Lille, Service de pédiatrie (Dr A. LAMBILLIOTE)	2	3,2%
CHU de Montpellier, Centre de compétence pédiatrique et por adultes Montpellier et Nîmes (Dr R. NAVARRO)	2	3,2%
Institut BERGONIE (Bordeaux), (Pr FX. MAHON)	1	1,6%
CHU de Bicêtre - AP-HP, Service de pédiatrie (Dr C. GUITTON)	1	1,6%
CH de Boulogne-sur-Mer, Service d'hématologie clinique (Dr BARRY)	1	1,6%
CH de Bourges, Service d'hématologie clinique (Dr A. MAAKAROUN)	1	1,6%
Institut d'hématologie et d'oncologie pédiatrique (IHOP, Lyon), (Dr C. PONDARRE)	1	1,6%
CHU de Nice, Service d'hématologie infantile (Dr F. MONPOUX)	1	1,6%
CHU Tenon - AP-HP (Paris), Service de néonatologie (Dr WIRTH)	1	1,6%
CHU Toulouse, Service d'hématologie pédiatrique (Dr MP. CASTEX)	1	1,6%
TOTAL	64	**100%**

Les origines géographiques des patients sont très diverses (*Tableau 10*).

Parmi les 60 sujets inclus, on dénombre :

- 27 hommes et 33 femmes.
- 58 patients actuellement en vie, et 2 décédés :
    - Un nouveau-né à l'âge de trois mois dans un contexte de d'ascite et d'hépatomégalie
    - Un homme de cinquante ans dans le cadre d'une cirrhose compliquant une hépatite virale C post-transfusionnelle.

L'âge médian à l'inclusion est de 23 ans (distribution de 1 à 70 ans). La répartition des patients en fonction de leur tranche d'âge au moment de la réalisation de l'étude est présentée en *Figure 22*.

Tableau 10 - *Origine géographique des **parents** des 60 patients inclus*

Origines géographiques des parents	**Effectif (n=120)**	**Proportion dans la population de l'étude**
France	94	76,7%
Italie	5	4,2%
Algérie	5	4,2%
Maroc	3	2,5%
Tunisie	2	1,7%
Chine	2	1,7%
USA	2	1,7%
Espagne	2	1,7%
Grèce	1	0,8%
Iran	2	0,8%
Vietnam	1	0,8%
Portugal	1	0,8%
TOTAL	**120**	**100%**

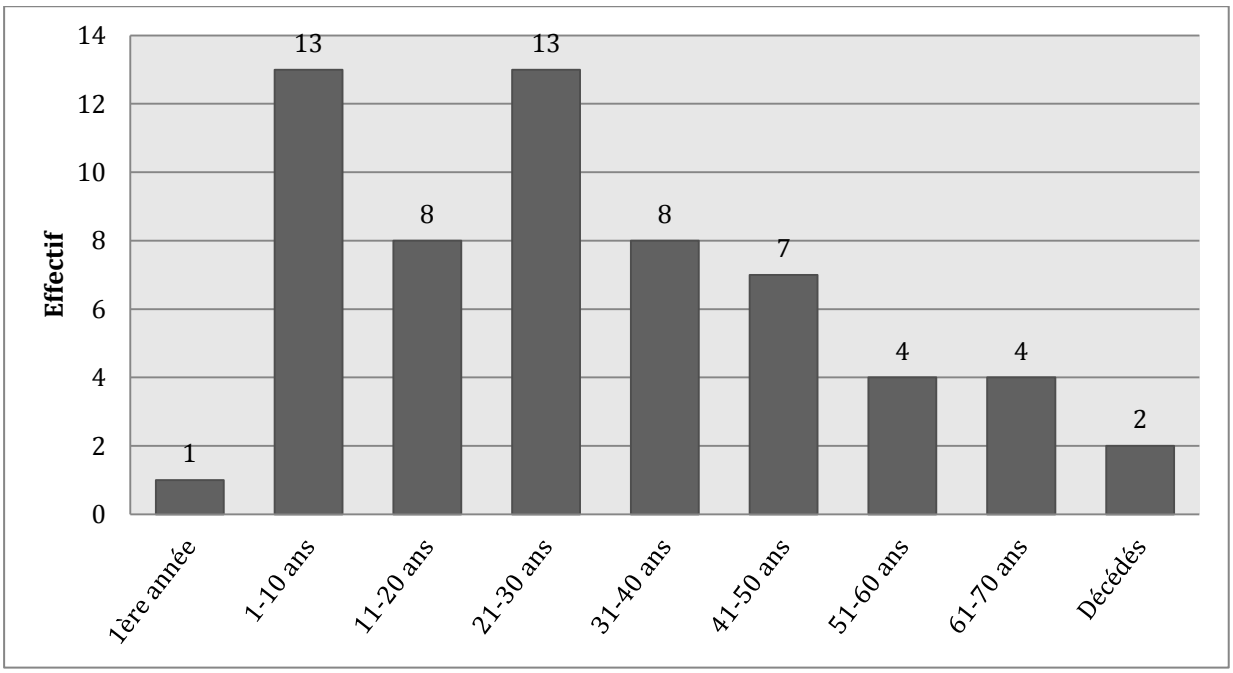


Figure 22 – *Répartition des patients par tranche d'âge à l'inclusion*

3.2.2. Présentation des groupes de sévérité phénotypique

Le phénotype sévère est majoritaire dans notre cohorte (58,3%, n=35). Le *Tableau 11* présente la composition des trois groupes.

Tableau 11 – *Composition de chacun des groupes de sévérité*

	Sévère	**Modéré**	**Mineur**
Effectif	35 (58,3%)	15 (25,0%)	10 (16,7%)
Âge moyen	24,2	27,1	37,1
Hommes/Femmes	15/20	5/10	7/3

3.2.3. Présentations cliniques

Les manifestations cliniques du déficit en PK intraérythrocytaire regroupent les caractéristiques habituelles d'une hémolyse chronique. Le degré de sévérité varie considérablement, allant de présentations bénignes à des formes néonatales mettant en jeu la survie et nécessitant des transfusions puis un support transfusionnel continu ultérieur.

3.2.3.1. Âge au diagnostic (voir *Figure 23*)

« L'âge au diagnostic » est défini par la première évocation du diagnostic dans le dossier clinique (avant même objectivation par mesure d'activité enzymatique puis génotypage).

Ce dernier a été massivement posé dans les 30 premiers jours de vie (n=20), et entre 1 mois et 2 ans pour 17 patients.

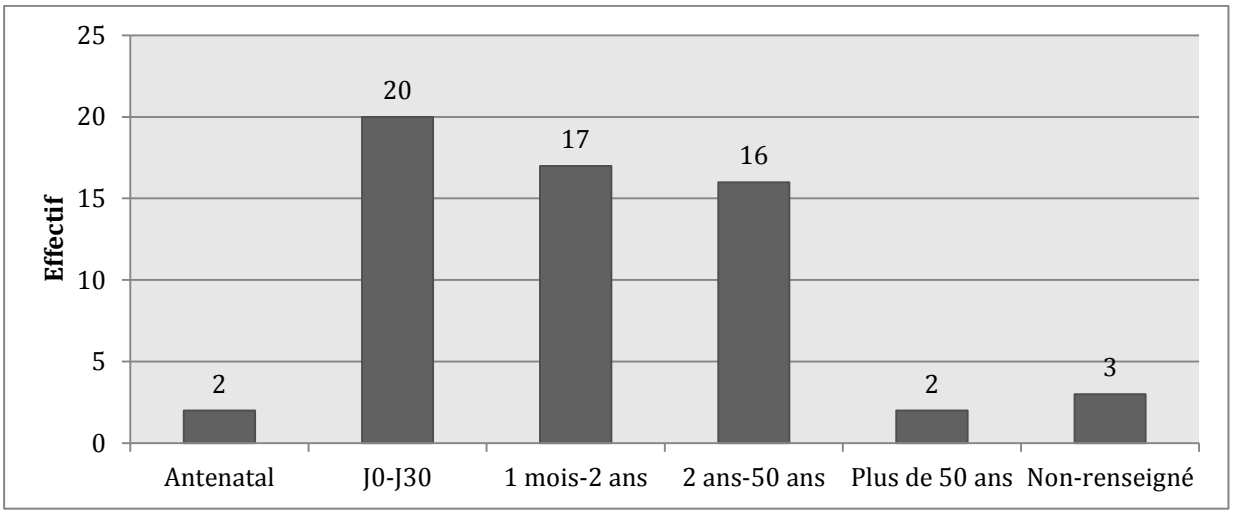


Figure 23 – *Âge au diagnostic*

80% des formes sévères et 75% des formes modérées sont diagnostiquées avant l'âge de 2 ans. Au contraire, 78% des patients présentant un phénotype mineur ont bénéficié d'un diagnostic après 2 ans (voir *Figure 24*)

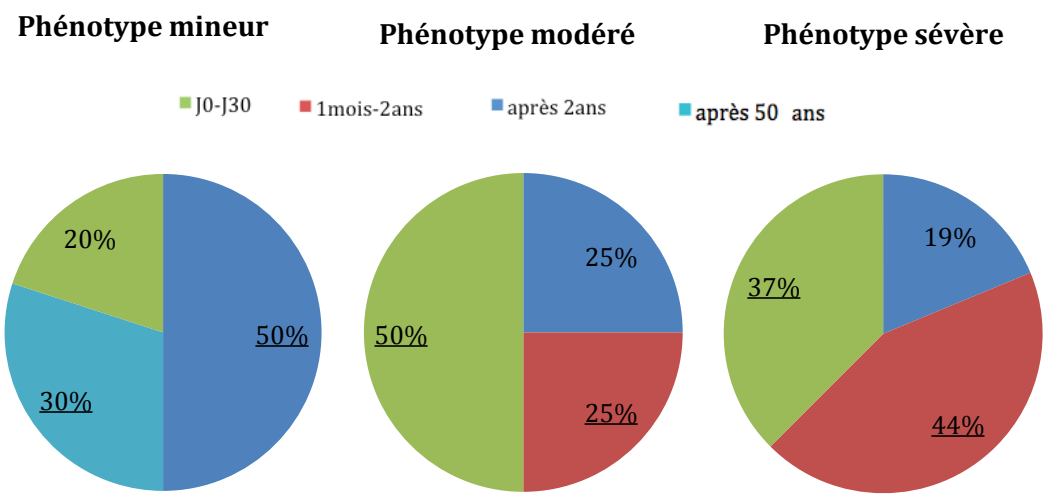


Figure 24 – *Âge au diagnostic en fonction de la sévérité phénotypique*

3.2.3.2. Circonstances cliniques

Le tableau clinique présenté par les patients déficitaires lors du diagnostic est différent en fonction de l'âge. On peut schématiquement distinguer deux périodes : périnatale et néonatale, puis le diagnostic chez le nourrisson, l'enfant et l'adulte.

La splénomégalie est un signe clinique retrouvé à tous les âges, mais elle est rarement présente chez les patients dont la sévérité phénotypique est mineure (*Figure 25*). Elle est rapportée dans les observations cliniques à l'âge médian de 2,5 ans (n=24).

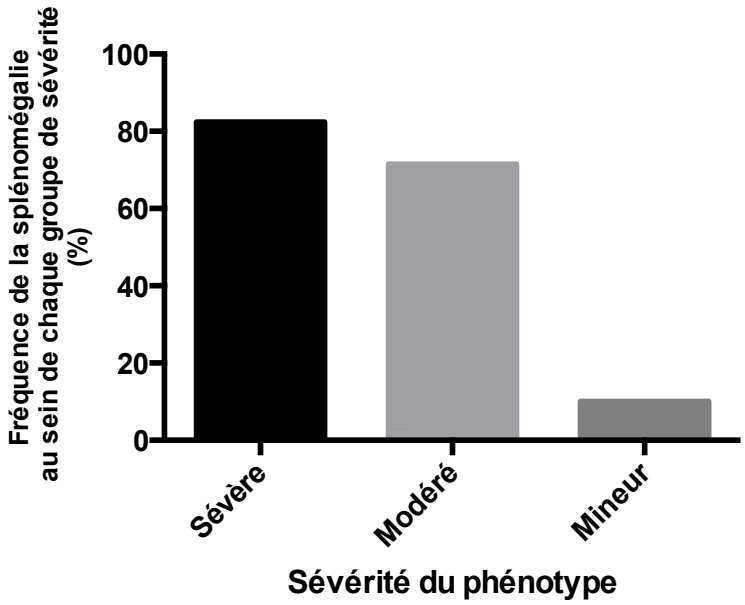


Figure 25 – *Prévalence de la splénomégalie au sein de chaque groupe de sévérité phénotypique (n=58, sévère=28/34, modéré=10/14, mineur=1/10)*

3.2.3.2.1. Période périnatale et néonatale

Le tableau clinique sur lequel s'appuie le diagnostic dans le premier mois de vie, comprend trois éléments récurrents (voir *Figure 26* et *Tableau 13*). L'ictère néonatal persistant est l'un des signes cliniques les plus fréquents. Puis suivent la splénomégalie et la pâleur cutanéomuqueuse, témoins de l'anémie.

Parmi les patients, deux ont présenté des événements néonataux aigus, cependant il est difficile d'imputer l'ensemble du tableau au seul déficit en pyruvate kinase intraérythrocytaire :

- Un choc néonatal avec détresse respiratoire
- Une ascite avec hépatomégalie suivies d'un décès à trois mois

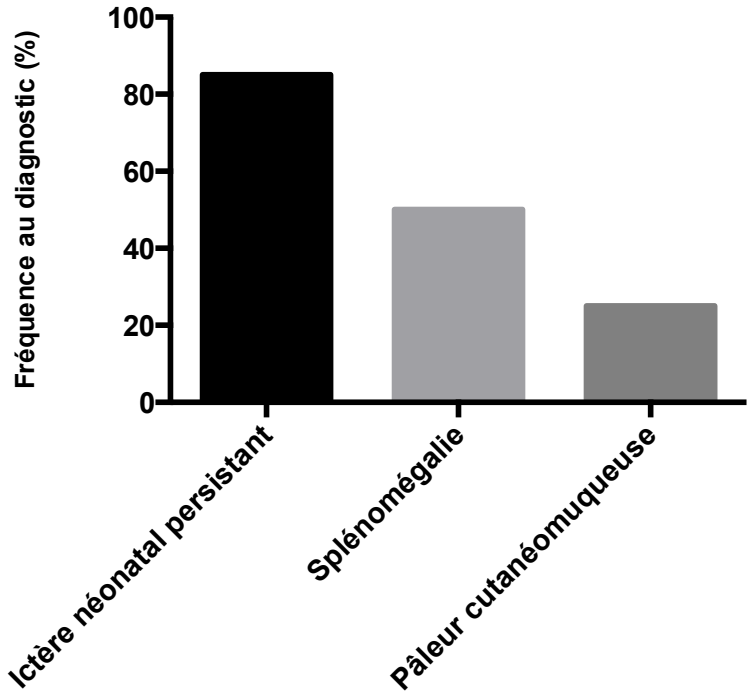


Figure 26 – *Fréquence respective des signes cliniques observés lors d'un diagnostic entre J0 et J30 de vie (n=21, ictère=18/21, splénomégalie=14/21, pâleur=8/21)*

3.2.3.2.2. Diagnostic après la période néonatale

Au delà du 30ème jour de vie et jusqu'à l'âge adulte, le déficit en pyruvate kinase a été évoqué sur la base du même trépied clinique : ictère – splénomégalie – pâleur.

Au delà de 30 ans, le tableau clinique contribuant à la découverte du déficit n'est pas comparable avec celui évoqué ci-dessus. En effet, ictère, splénomégalie et signes cliniques d'anémie sont relégués au second plan par des complications de l'hémolyse chronique : hémochromatose ou lithiases biliaires symptomatiques.

3.2.4. Bilan biologique de base lors du diagnostic

3.2.4.1. Taux d'hémoglobine (*Figure 27*)

La période néonatale est marquée par un taux d'hémoglobine effondré. Son taux moyen (déterminé sur 13 nouveaux-nés) est de 8,6g/dL (minimum=4,8g/dL, maximum=12,3) pour une norme entre 14 et 23 g/dL à la naissance.

Entre 1 mois et 2 ans, le taux est également faible : moyenne à 6,8g/dL au diagnostic (n=8).

En revanche, lors d'un diagnostic au delà de 2 ans (n=12), le taux moyen d'hémoglobine est plus élevé (10,4g/dL).

3.2.4.2. Réticulocytes (*Figure 28*)

La réticulocytose est franche lorsque le diagnostic est posé avant l'âge de 2 ans :

- Avant 30 jours de vie, le taux moyen est de 350G/L (n=10), ne diminuant pas en fin de première semaine de vie et après l'érythropoïèse de stress (80,81).
- Entre 1 mois et 2 ans, le taux moyen de 332G/L (n=6) constitue à cet âge une augmentation significative.

Chez des patients dont le déficit est objectivé après deux ans, le profil est constamment régénératif : 219G/L (n=11).

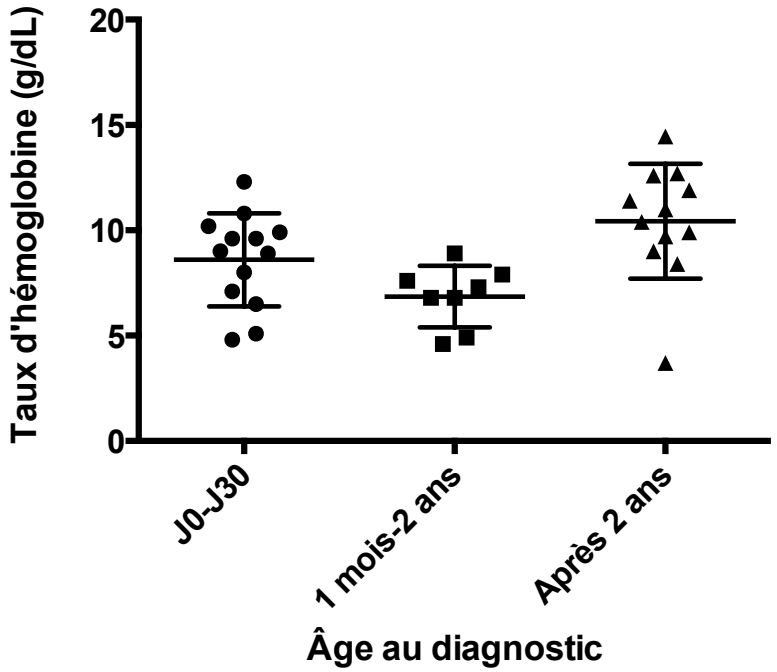


Figure 27 –*Taux d'hémoglobine initial en fonction de l'âge au diagnostic (n=33)*

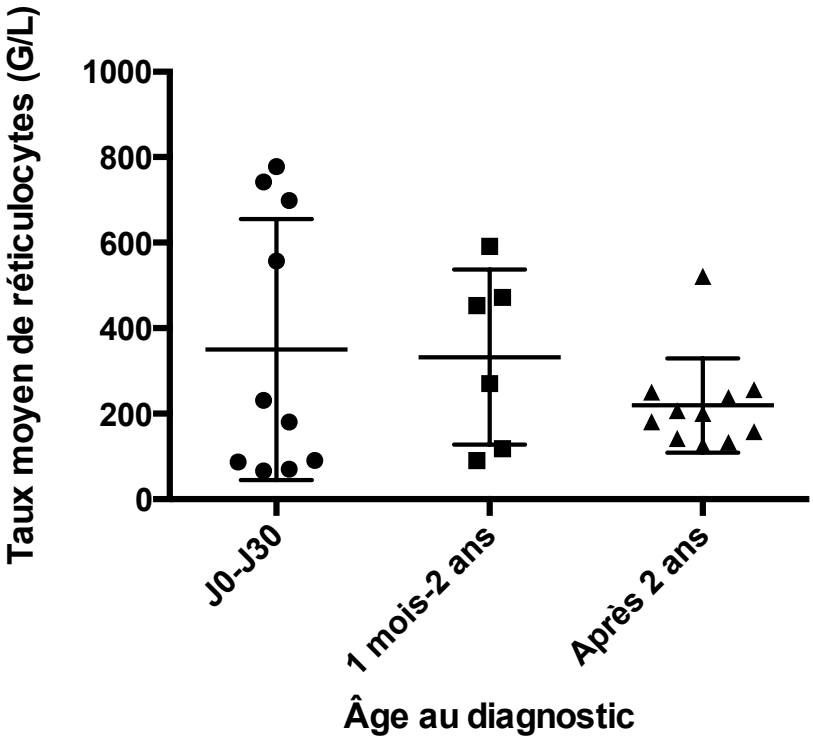


Figure 28 –*Réticulocytes en fonction de l'âge au diagnostic (n=27)*

3.2.4.3. Bilan biochimique

Le profil biologique est celui d'une anémie hémolytique.

3.2.4.3.1. Bilirubinémie

L'hyperbilirubinémie dans la période néonatale est multifactorielle allant du physiologique au pathologique. Elle est constamment retrouvée chez les patients déficitaires, quasi-exclusivement non-conjuguée, et son taux est d'abord élevé au cours du premier mois de vie, puis décroît progressivement pour se stabiliser à des valeurs intermédiaires :

- Au cours du premier mois de vie, le taux moyen est de 190 µmoles/L (n=8)
- Après 1 mois, la bilirubinémie moyenne est de 51 µmoles /L (n=16).

3.2.4.3.2. Autres marqueurs biochimiques d'hémolyse

Les autres stigmates biochimiques d'hémolyse regroupent systématiquement :

- Une haptoglobine sérique constamment effondrée
- Une LDH sérique augmentée

3.2.4.4. Biologie au diagnostic et sévérité du phénotype actuel (*Tableau 12*)

Les patients de phénotype sévère ont, au diagnostic, une hémoglobine plus basse et une plus forte réticulocytose que chez les patients présentant un phénotype modéré ou sévère.

Tableau 12 - *Biologie au diagnostic en fonction de la sévérité*

	Sévère	**Modéré**	**Mineur**
Hémoglobine (g/dL)	7,73 (n=20)	8,86 (n=6)	10,9 (n=7)
Réticulocytes (G/L)	417,4 (n=13)	172,4 (n=5)	190 ,4 (n=7)
Bilirubinémie (micromoles/L)	119,6 (n=13)	105,8 (n=4)	38,8 (n=5)

3.2.5. Activités enzymatiques

Après élimination de causes d'hémolyse extracorpusculaire allo- ou auto-immune (test de Coombs négatif, voire test de Kleihauer dans les formes néonatales aiguës), médicamenteuse, toxique ou mécanique, les causes intrinsèques ont été recherchées : hémoglobinopathie, pathologie de membrane et déficits enzymatiques.

Comme exposé précédemment, l'activité de la PK intraérythrocytaire ne peut être interprétée qu'en comparaison avec celle d'une autre enzyme érythrocytaire, préférentiellement l'hexokinase.

Le profil enzymatique du patient déficitaire en pyruvate kinase est le suivant (*Figures 29 et 30*) :

- Activité pyruvate kinase **abaissée** dans 95,2% des cas (39/40) : activité résiduelle moyenne égale à 39,2% de la norme basse (données disponibles pour 40 patients)
- Activité G6PD **normale** dans 54,3% des cas, **à augmentée** pour 45,7% des patients (données disponibles pour 35 patients)
- Activité hexokinase **élevée** dans l'ensemble des cas (données disponibles pour 19 patients)

Nous disposons des activités enzymatiques pyruvate kinase pour 52 parents des cas index, tous hétérozygotes. L'activité résiduelle moyenne est supérieure à celle des homozygotes et hétérozygotes composites : 60,9% de la norme basse. Aucun de ces patients hétérozygotes ne présente de signe clinique d'hémolyse chronique.

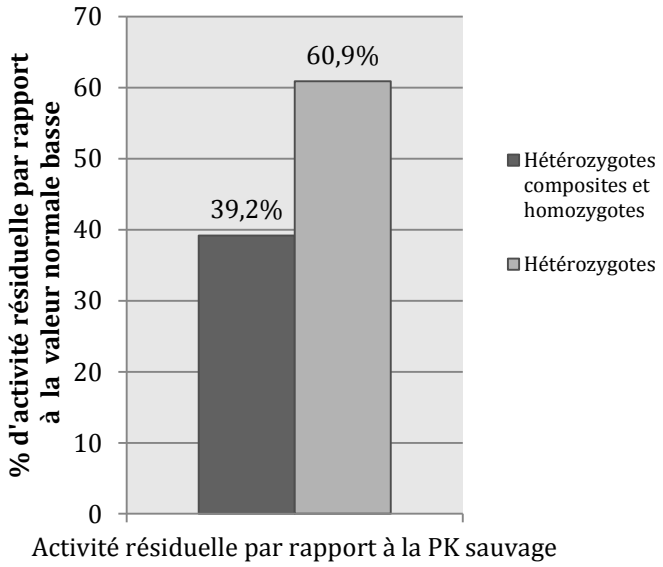


Figure 29–*Activités enzymatiques de pyruvate kinase intraérythrocytaire chez les homozygotes et hétérozygotes composites pour des mutations de PKLR versus les hétérozygotes*

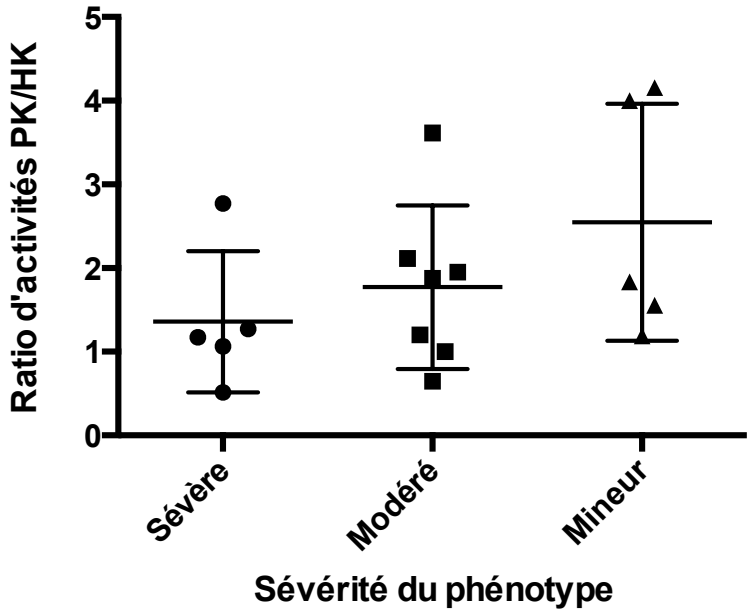


Figure 30–Ratio d'a*ctivités enzymatiques PK/HK en fonction de la sévérité du phénotype (pour n=17 patients)*

Les *Tableau 13, 14 et 15* présentent une confrontation entre données biologiques et cliniques pour 56 patients déficitaires. Les informations disponibles pour 4 patients sont insuffisantes pour être présentées.

Tableau 13 (1/3) – *Paramètres biologiques au diagnostic et présentation clinique lors d'un* ***diagnostic entre la naissance et le 30ème jour de vie***

N°	Hémoglobine (g/dL)	Réticulocytes (G/L)	Bilirubine totale (microM/L)	Activité PK	Activité G6PD	Activité HK	Présentation clinique
Li01	4,8	87	NC	NC	NC	NC	• Détresse respiratoire et choc néonatal, splénomégalie → réanimation néonatale et transfusion
Bd09	5,1	231	212	NC	NC	NC	• Extraction à terme par césarienne pour souffrance foetale aiguë • Ictère, hépatosplénomégalie → réanimation néonatale et transfusion
Ma05	6,5	180	53	1.1U/gHb (N=14-19)	15.5U/gHb (N=11-17)	1.7U/gHb (N=0,74-1,14)	• Ictère persistant à 4 semaines de vie, splénomégalie
Bd03	7,1	90	NC	238mU/mLGR (Témoin=220)	210mU/mLGR (Témoin=120)	NC	• Franche pâleur néonatale et ictère, splénomégalie
Cr06	8	NC	NC	0.2U/gHb (N=5,9-8,1)	6.2U/gHb (N=5,3-7,9)	1.4U/gHb (N=0,74-1,14)	• Ictère néonatal persistant, splénomégalie • Frère déficitaire en PK

Tableau 13 (suite, 2/3) – *Paramètres biologiques au diagnostic et présentation clinique lors d'un* ***diagnostic entre la naissance et le 30ème jour de vie***

N°	Hémoglobine (g/dL)	Réticulocytes (G/L)	Bilirubine totale (microM/L)	Activité PK	Activité G6PD	Activité HK	Présentation clinique
Cr16	8.1	NC	NC	1.03U/gHb (N=5,6-13,6)	15.73U/gHb (N=7-12,3)	2U/gHb (N=0,7-1,8)	• Extraction à terme par césarienne pour souffrance foetale aiguë • Pâleur, ictère, splénomégalie et hypotonie à 24h de vie → réanimation néonatale et transfusion • (GILBERT 7/7 associé)
Lc01	8.5	NC	NC	NC	NC	NC	• Déficit en PK chez le père, la mère et le frère
Ma02	8,9	66	NC	2.8U/gHb (N=14-19)	14U/gHb (N=11-17)	1.8U/gHb (N=0,74-1,14)	• Ictère important à 24h de vie (GILBERT 7/7 associé)
Bd06	9	NC	215	NC	NC	NC	• Ictère néonatal persistant
Bd05	9,6	557	103	NC	NC	NC	• Ictère néonatal persistant et pâleur • Frère aîné déficitaire en PK

Tableau 13 (suite, 3/3) – *Paramètres biologiques au diagnostic et présentation clinique lors* ***d'un diagnostic entre la naissance et le 30ème jour de vie***

N°	Hémoglobine (g/dL)	Réticulocytes (G/L)	Bilirubine totale (microM/L)	Activité PK	Activité G6PD	Activité HK	Présentation clinique
Bd10	9,6	778	150	4U/gHb (N=5,9-8,1)	NC	NC	• Ictère néonatal persistant, splénomégalie Soeur aînée déficitaire en PK
Cr13	9,9	699	147	1.2U/gHb (N=5,9-8,1)	13.5U/gHb (N=5,3-7,9)	NC	• Ictère néonatal persistant et pâleur, splénomégalie
Tn01	10,2	70	314	6U/gHb (N=11-41)	24U/gHb (N=8-22)	3.2U/gHb (N=0,74-1,14)	• Ictère néonatal marqué à 10 jours de vie
Cr10	12,3	742	NC	3.4U/gHb (N=5,9-8,1)	8.8U/gHb (N=5,3-7,9)	3.2U/gHb (N=0,74-1,14)	• Ictère, splénomégalie • Grand-mère maternelle déficitaire en PK
Tl01	NC	NC	NC	8.6 U/gHb (N=14-19)	NC	NC	• Ictère néonatal persistant et pâleur (GILBERT 7/7 associé)
Bd07	NC	NC	NC	3.9 U/gHb (N=14-19)	21.4 U/gHb (N=11-17)	2 U/gHb (N=0,74-1,14)	• Ictère néonatal persistant
Cr03	NC	NC	NC	1,5 U/gHb (N=5,9-8,1)	7 U/gHb (N=5,3-7,9)	1,5 U/gHb (N=0,74-1,14)	• Exploration d'une anémie néonatale
Bd11	NC	NC	NC	NC	NC	NC	• Hépatomégalie, hypertension portale, ascite, insuffisance cardiaque
Li01	NC	NC	NC	NC	NC	NC	• Ictère néonatal persistant
Li02	NC	NC	NC	NC	NC	NC	• Ictère néonatal persistant (maladie de Gilbert associée)
Ih01	NC	NC	NC	NC	NC	NC	• Ictère néonatal persistant

Tableau 14 (1/2) – *Paramètres biologiques au diagnostic et présentation clinique lors d'un* ***diagnostic entre le 1er mois de vie et l'âge de 2 ans***

N°	Hémoglobine (g/dL)	Réticulocytes (G/L)	Bilirubine totale (microM/L)	Activité PK	Activité G6PD	Activité HK	Présentation clinique
Bd08	4,6	90	NC	NC	NC	NC	• Pâleur et asthénie, splénomégalie
Ma03	4,9	453	31	9UI/1011GR (N=36-58)	22UI/1011GR (N=12-22)	NC	• Asthénie, pâleur et ictère, splénomégalie à 3 mois de vie
Bd04	6,8	NC	24	0.809/mL GR (N=3,63-3,73)	1.68/mL GR (N=1,33-1,81)	0.41/mL GR (N=0,162-0,214)	• Pâleur et ictère, splénomégalie à 9 mois de vie
Ni09	6,8	270	26	4.6U/gHb (N=14-19)	15.9U/gHb (N=11-17)	NC	• Pâleur, ictère et asthénie, splénomégalie
Di01	7,3	571	211	NC	NC	NC	• Pâleur, dyspnée et ictère à 19 mois de vie • Tante maternelle déficitaire en PK
Lc04	7,6	NC	23	1,72U/mL GR (N=1,1-2,7)	2,25U/mL GR (N=1,1-2,5)	NC	• Exploration d'une pâleur et d'un ictère à 1 an de vie
Di02	7,9	472	23	4.2U/gHb (N=5,9-8,1)	9U/gHb (N=5,3-7,9)	3.3U/gHb (N=0,74-1,14)	• Ictère persistant
Kb01	8,9	118	38	5.5U/gHb (N=14-19)	14.2U/gHb (N=11-17)	2.6U/gHb (N=0,74-1,14)	• Ictère et pâleur à 5 mois de vie

Tableau 14 (suite, 2/2) – *Paramètres biologiques au diagnostic et présentation clinique lors d'un* ***diagnostic entre le 1er mois de vie et l'âge de 2 ans***

N°	Hémoglobine (g/dL)	Réticulocytes (G/L)	Bilirubine totale (microM/L)	Activité PK	Activité G6PD	Activité HK	Présentation clinique
Cr14	NC	NC	NC	1.4U/gHb (N=5,9-8,1)	10.6 U/gHb (N=5,3-7,9)	NC	• Ictère persistant
Cr01	NC	NC	NC	4.4 U/gHb (N=14-19)	15.3 U/gHb (N=11-17)	NC	• Ictère persistant, hépatosplénomégalie (GILBERT 7/7 associé)
Ly02	NC	NC	NC	6 U/gHb (N=22-53)	NC	NC	• Diagnostic à 18 mois
Bd01	NC	NC	NC	2.5 U/gHb (N=5,9-8,1)	9 U/gHb (N=5,3-7,9)	NC	• Pâleur
Cr07	NC	NC	NC	3.3 U/gHb (N=5,9-8,1)	14.5 U/gHb (N=5,3-7,9)	NC	• Diagnostic à 3 ans
Cr04	NC	NC	NC	2.1 U/gHb (N=5,9-8,1)	5.6 U/gHb (N=5,3-7,9)	1.79 U/gHb (N=0,74-1,14)	• Erythroblastopénie aiguë à l'âge de 2 ans, amenant au diagnostic
Ma06	NC	NC	NC	6.1 U/gHb (N=14-19)	19 U/gHb (N=11-17)	2.2 U/gHb (N=0,74-1,14)	• Ictère persistant à 21 mois de vie
Cr02	NC	NC	NC	1.8 U/gHb (N=5,9-8,1)	7.5 U/gHb (N=5,3-7,9)	1.5 U/gHb (N=0,74-1,14)	• NC (GILBERT 7/7 associé)
Cr11	NC	NC	NC	6.2 U/gHb (N=14-19)	NC	NC	• Ictère persistant

Tableau 15 (1/2) – *Paramètres biologiques au diagnostic et présentation clinique lors d'un* ***diagnostic au delà de 2 ans***

N°	Âge au diagnostic	Hémoglobine (g/dL)	Réticulocytes (G/L)	Bilirubine totale (microM/L)	Activité PK	Activité G6PD	Activité HK	Présentation clinique
Lc02	NC	3,7	NC	NC	NC	NC	NC	• Pâleur, dyspnée et ictère, splénomégalie • Retard de croissance staturo-pondéral
Lc05	5 ans	8,4	207	54	1.8U/gHb (N=5,9-8,1)	222U/gHb (N=120-220)	NC	• Ictère à l'âge de 5 ans
Ro03	13 ans	9	250	NC	4,5U/gHb (N=9,8-15)	11U/gHb (N=5,3-7,9)	NC	• Ictère se majorant et splénomégalie objectivée à 12 ans
Ma01	9 ans	9,7	256	NC	1.6U/gHb (N=5,9-8,1)	6.6U/gHb (N=5,3-7,9)	NC	• Asthénie et pâleur à 9 ans, splénomégalie
Lc03	4 ans	9,9	238	40	11.2U/gHb (N=14-19)	15.2U/gHb (N=11-17)	3.1U/gHb (N=0,74-1,14)	• Ictère à 4 ans, splénomégalie apparaissant à 7 ans
Ro01	33 ans	10,4	142	25	1.6U/gHb (N=5,9-8,1)	5.4U/gHb (N=5,3-7,9)	NC	• Asthénie à 33 ans
Cr12	53 ans	11	521	28	3.1U/gHb (N=5,9-8,1)	9.1U/gHb (N=5,3-7,9)	NC	• Exploration d'un ictère à l'âge de 53 ans
Bl01	21 ans	11,4	125	127	1.8U/gHb (N=14-19)	NC	NC	• Cholécystite aiguë à 21 ans • Splénomégalie découverte à cette occasion

Tableau 15 (suite, 2/2) – *Paramètres biologiques au diagnostic et présentation clinique lors d'un* ***diagnostic au delà de 2 ans***

N°	Âge au diagnostic	Hémoglobine (g/dL)	Réticulocytes (G/L)	Bilirubine totale (microM/L)	Activité PK	Activité G6PD	Activité HK	Présentation clinique
Di03	14 ans	11,9	181	43	2.5U/gHb (N=14-19)	17.4gU/Hb (N=11-17)	2.1U/gHb (N=0,74-1,14)	• Découverte fortuite à 14 ans sur une numération globulaire • Absence de signes cliniques
Cr09	62 ans	12.6	158	39	7.9U/gHb (N=14-19)	15U/gHb (N=11-17)	1.9U/gHb (N=0,74-1,14)	• Hémochromatose compliquée de fibrose hépatique à 60 ans
Cr08	34 ans	12,7	133	16	2.4U/gHb (N=5,9-8,1)	4.7 U/gHb (N=5,3-7,9)	NC	• Hémochromatose diagnostiquée à 33 ans
Cr15	12 ans	14,46	200	82	3,3 U/gHb (N=14-19)	12,7gU/Hb (N=11-17)	1.8U/gHb (N=0,74-1,14)	• Ictère conjonctival et asthénie en 1998
Lc06	20 ans	NC	NC	NC	4.8 U/gHb (N=14-19)	140U/gHb (N=120-220)	1.2 U/gHb (N=0,74-1,14)	• Exploration d'un ictère à l'âge de 20 ans
Bd02	NC	NC	NC	NC	1.8 U/gHb (N=5,9-8,1)	13.7 U/gHb (N=5,3-7,9)	NC	• Exploration d'une anémie
Ro02	5 ans	NC	NC	NC	NC	NC	NC	• Ictère et pâleur explorés à l'âge de 5 ans
Ma08	21 ans	NC	NC	NC	NC	NC	NC	• Exploration d'une anémie hémolytique à l'âge de 21 ans
Ro06	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	• Asthénie, pâleur, ictère et splénomégalie à l'âge de 4 ans

3.2.6. Génotypage

Les 60 patients inclus présentent plus de 50 mutations distinctes de *PKLR*, parmi plus de 220 mutations enregistrées dans les bases de données. En effet, les mutations sont essentiellement privées et donc nombreuses.

Nous présentons dans le *Tableau 16* les génotypes des 60 patients inclus.

Deux mutations ont une prévalence dominante :

- p.Arg510Gln dans le cadre d'un phénotype sévère
- p.Arg486Trp dans le cadre d'un phénotype modéré à sévère

Tableau 16 (1/5) – *Génotypes des 60 patients inclus* (*=nouvelle mutation, non-publiée)

Patient	Âge actuel (années)	Âge au diagnostic	Taux actuel d'hémoglobine (g/dL)	Taux actuel de réticulocytes	Splénectomie	Variant 1 de PK / ou mutation et référence bibliographique	Variant 2 de PK / ou mutation et référence bibliographique	Phénotype
Tn01	1	J0-J30	9.6	NR	Non	p.Gly358Arg exon 8 (82)	p.Arg486Trp exon 11 (83)	Modéré
Di01	2	1mois-2ans	Transfusé	Transfusé	Non	**ivs 7 +1G>A ***	**ivs 7 +1G>A ***	Sévère
Bd05	2	NR	5.8	252	Non	p.Arg426Trp exon 10 (74)	**p.Val349Phe exon 8***	Sévère
Bd09	2	J0-J30	Transfusé	Transfusé	Oui	**p.Arg289Trp exon 7***	**p.Asp339Gly exon 8***	Sévère
Ma02	3	J0-J30	11.8	105	Non	p.Arg479Cys exon 10 (84)	**ivs 11 +1G>A***	Mineur
Ih01	3	J0-J30	9.3	217	Non	p.Arg486Trp exon 11 (83)	**p.Gly411Asp exon 9***	Modéré
Kb01	3	1mois-2ans	10.4	123	Non	p.Arg510Gln exon 11 (83)	p.Arg510Gln exon 11 (83)	Modéré
Bd06	4	J0-J30	7.2	259	Non	p.Arg486Trp exon 11 (83)	**p.Val349Phe exon 8***	Sévère
Ni01	4	1mois-2ans	7.9	NR	Non	p.Arg488Gln exon 11 (85)	p.Arg488Gln exon 11 (85)	Sévère
Li01	6	J0-J30	Transfusé	Transfusé	Non	p.Ala495Thr exon 11 (85)	**ins alu exon 7***	Sévère
Cr13	7	J0-J30	Transfusé	Transfusé	Non	p.Arg510Gln exon 11 (83)	ivs 11 +1G>C (86)	Sévère
Ma04	8	J0-J30	NR	NR	Non	p.Glu318del exon 7 (86)	**c.315FS exon 4***	Sévère
Di02	9	1mois-2ans	7.9	454	Non	p.Asn393Lys exon 9 (74)	p.Arg486Trp exon 11 (83)	Sévère
Tl01	9	J0-J30	9.7	1710	Oui	p.Val134Asp exon 5 (83)	p.Arg426Trp exon 10 (74)	Sévère
Lc01	10	antenatal	Transfusé	Transfusé	Oui	p.Cys360Tyr exon 8 (86)	p.Arg479His exon 10+splice (87)	Sévère
Lc02	11	>2ans	Transfusé	NR	Non	p.Cys360Tyr exon 8 (86)	p.Arg479His exon 10+splice (87)	Sévère

Tableau 16 (suite, 2/5) – *Génotypes des 60 patients inclus* (*=nouvelle mutation, non-publiée)

Patient	Âge actuel (années)	Âge au diagnostic	Taux actuel d'hémoglobine (g/dL)	Taux actuel de réticulocytes	Splénectomie	Variant 1 de PK / ou mutation et référence bibliographique	Variant 2 de PK / ou mutation et référence bibliographique	Phénotype
Bd10	12	NR	8.5	NR	Oui	ivs 9 c.1269 +5G>A (86)	**p.Ala110FS exon 4***	Sévère
Di03	15	>2ans	11	213	Non	**p.Asp311Glu exon 7***	p.Asp339His exon 8 (88)	Mineur
Bd03	15	J0-J30	11.3	255	Non	**del1240bp exon 11**	**-284delT promoteur***	Mineur
Li02	15	J0-J30	8.5	105	Non	ivs 4 + 10 G>T (splice) (86)	ivs 4 + 10 G>T (splice) (86)	Modéré
Bd01	18	1mois-2ans	7.9	550	Non	p.Arg385Lys exon 9 (86)	p.Tyr408Ile exon 9 (88)	Sévère
Ma03	18	1mois-2ans	8.2	502	Oui	p.Arg510Gln exon 11 (83)	p.Arg532Trp exon11 (76)	Sévère
Bd08	19	1mois-2ans	Transfusé	NR	Oui	**p.Gly232Ser exon11/splice***	p.Arg510Gln exon 11 (83)	Sévère
Bl01	21	>2ans	10	125	Non	**p.Gln421Arg exon 9***	p.Arg486Trp exon 11 (83)	Modéré
Ma01	21	>2ans	9.6	160	Non	p.Arg486Trp exon 11 (83)	p.Tyr408Ile exon 9 (88)	Modéré
Ma05	22	J0-J30	11.6	167	Non	p.Glu172Gln exon 6 (75)	p.Arg510Gln exon 11 (83)	Modéré
Mo02	22	J0-J30	11.1	NR	Oui	p.Asn393Ser exon 9 (74)	p.Arg486Trp exon 11 (83)	Sévère
Cr16	22	antenatal	6.8	NR	Oui	p.Arg510Gln exon 11 (83)	p.Arg488stop (85)	Sévère
Cr07	23	1mois-2ans	Transfusé	Transfusé	Oui	p.Arg270stop exon 7 (74)	p.Arg479His exon 10+splice (87)	Sévère

Tableau 16 (suite, 3/5)– *Génotypes des 60 patients inclus* (*=nouvelle mutation, non-publiée)

Patient	Âge actuel (années)	Âge au diagnostic	Taux actuel d'hémoglobine (g/dL)	Taux actuel de réticulocytes	Splénectomie	Variant 1 de PK / ou mutation et référence bibliographique	Variant 2 de PK / ou mutation et référence bibliographique	Phénotype
Cr04	23	1mois-2ans	7.8	233	Non	p.Asn393Ser exon 9 (74)	p.Arg486Trp exon 11 (83)	Sévère
Ly01	24	NR	Transfusé	NR	Oui	p.Ala495Thr exon 11 (85)	p.Ala495Thr exon 11 (85)	Sévère
Lc05	25	>2ans	Transfusé	Transfusé	Non	p.Lys410Glu exon 9 (86)	p.Lys410Glu exon 9 (86)	Sévère
Lc03	26	>2ans	9.4	238	Non	p.Arg486Trp exon 11 (83)	p.Asn393Ser exon 9 (74)	Modéré
Cr15	27	>2ans	13.2	194	Non	p.Asn393Ser exon 9 (74)	**ivs 11 +1G>A***	Mineur
Ly02	29	1mois-2ans	9.7	200	Non	**p.Gly411Asp exon 9***	p.Arg486Trp exon 11 (83)	Modéré
Cr10	30	J0-J30	Transfusé	Transfusé	Oui	p.Glu232Cys exon (splice) (89)	p.Val506Ile exon 11 (90)	Sévère
Bd04	31	1mois-2ans	7.4	240	Oui	p.Thr371Ile exon 8 (86)	p.Arg510Gln exon 11 (83)	Sévère
Lc06	32	>2ans	11.5	136	Non	p.Arg559Gly exon 12 (74)	**del promoteur nt.125-136 166bp***	Mineur
Ib02	32	NR	NR	NR	Non	**p.Ser389Arg exon 9***	p.Arg569Gln exon12 (91)	Modéré
Ro02	33	>2ans	7	720	Oui	p.Arg510Gln exon 11 (83)	p.Arg510Gln exon 11 (83)	Sévère
Cr04	39	NR	9.3	168	Non	p.Arg486Trp exon 11 (83)	**Glu318stop exon 7***	**Sévère**
Cr01	40	1mois-2ans	8.7	602	Oui	p.Arg510Gln exon 11 (83)	p.Arg510Gln exon 11 (83)	Sévère

Tableau 16 (suite, 4/5)– *Génotypes des 60 patients inclus* (*=nouvelle mutation, non-publiée)

Patient	Âge actuel (années)	Âge au diagnostic	Taux actuel d'hémoglobine (g/dL)	Taux actuel de réticulocytes	Splénectomie	Variant 1 de PK / ou mutation et référence bibliographique	Variant 2 de PK / ou mutation et référence bibliographique	Phénotype
Cr06	40	J0-J30	8.5	375	Non	p.Lys365Met exon 8 (91)	p.Arg510Gln exon 11 (83)	Modéré
Bd07	40	J0-J30	9.7	102	Non	**p.Gly319Asp exon 7***	p.Arg486Trp exon 11 (83)	Modéré
Ro03	41	>2ans	8.8	435	Oui	p.Arg486Trp exon 11 (83)	p.Thr371Ile exon 8 (86)	Sévère
Ro06	42	>2ans	7.8	NR	Oui	p.Arg510Gln exon 11 (83)	p.Glu241stop exon 7 (83)	Sévère
Lc04	42	>2ans	Transfusé	Transfusé	Oui	p.Arg479His exon 10+splice (87)	p.Arg510Gln exon 11 (83)	Sévère
Cr05	43	NR	12.9	NR	Non	**p.Asn253Lys exon 7***	**-284delT promoteur***	Mineur
Ro01	45	>2ans	11.1	126	Non	p.Gly159Val exon 5 (92)	p.Arg486Trp exon 11 (83)	Mineur
Cr14	47	1mois-2ans	Transfusé	Transfusé	Oui	p.Ser120Phe exon 4 (93)	p.Arg510Gln exon 11 (83)	Sévère
Cr02	49	1mois-2ans	10.7	NR	Non	p.Arg486Trp exon 11 (83)	p.Tyr408Ile exon 9 (88)	Modéré
Cr08	52	>2ans	12.5	NR	Non	p.Asn393Ser exon 9 (74)	ivs 4 + 10 G>T (splice) (86)	Mineur
Cr11	56	1mois-2ans	9.5	1150	Oui	p.Asn393Ser exon 9 (74)	p.Arg510Gln exon 11 (83)	Sévère
Mo01	57	NR	9	NR	Oui	p.Arg486Trp exon 11 (83)	p.Arg337Trp exon 8 (86)	Sévère

Tableau 16 (suite, 5/5)– *Génotypes des 60 patients inclus* (*=nouvelle mutation, non-publiée)

Patient	Âge actuel (années)	Âge au diagnostic	Taux actuel d'hémoglobine (g/dL)	Taux actuel de réticulocytes	Splénectomie	Variant 1 de PK / ou mutation et référence bibliographique	Variant 2 de PK / ou mutation et référence bibliographique	Phénotype
Ma06	58	1mois-2ans	10.8	900	Oui	p.Asn393Ser exon 9 (74)	p.Arg486Trp exon 11 (83)	Sévère
Ma07	66	NR	8	363	Oui	p.Arg486Trp exon 11 (83)	p.Glu318del exon 7 (86)	Sévère
Ma08	66	>2ans	8.6	179	Non	p.Arg486Trp exon 11 (83)	p.Arg337Trp exon 8 (86)	Modéré
Cr09	69	>50ans	13.2	188	Non	p.Arg486Trp exon 11 (83)	**p.Arg293Glu***	Mineur
Cr12	70	>50ans	11.1	NR	Non	p.Met568val exon 11 (86)	p.Met568val exon 11 (86)	Mineur
Bd11	Décès	J0-J30	Transfusé	Transfusé	Non	ivs 9 c.1269 +5G>A (86)	**p.Ala110FS exon 4***	Sévère
Bd02	Décès	NR	8.4	1187	Oui	p.Arg385Lys exon 9 (86)	Glu241stop exon 7 (83)	sévère

3.2.7. Prise en charge

3.2.7.1. Transfusions

42 (70%) patients ont été transfusés, dont au moins 17 ont reçu leur première transfusion de culots globulaires en période néonatale (âge de la première transfusion connue pour 29 patients).

30/35 déficitaires diagnostiqués dans les deux premières années de vie, ont bénéficié d'un support transfusionnel (soit 85,7%), contre 7/18 (38,9%) pour un diagnostic après deux ans.

Les besoins transfusionnels actuels sont connus pour 35 patients sur les 42 individus transfusés (données manquantes pour 7 patients). 14 de ces patients transfusés au moins une fois (40%, âge moyen 19,2 ans), ont un régime transfusionnel en cours, dont 9, malgré une splénectomie. Le régime transfusionnel a pu être interrompu dans 21 cas, dont 11 après splénectomie.

Ces données sont récapitulées sur la *Figure 31*.

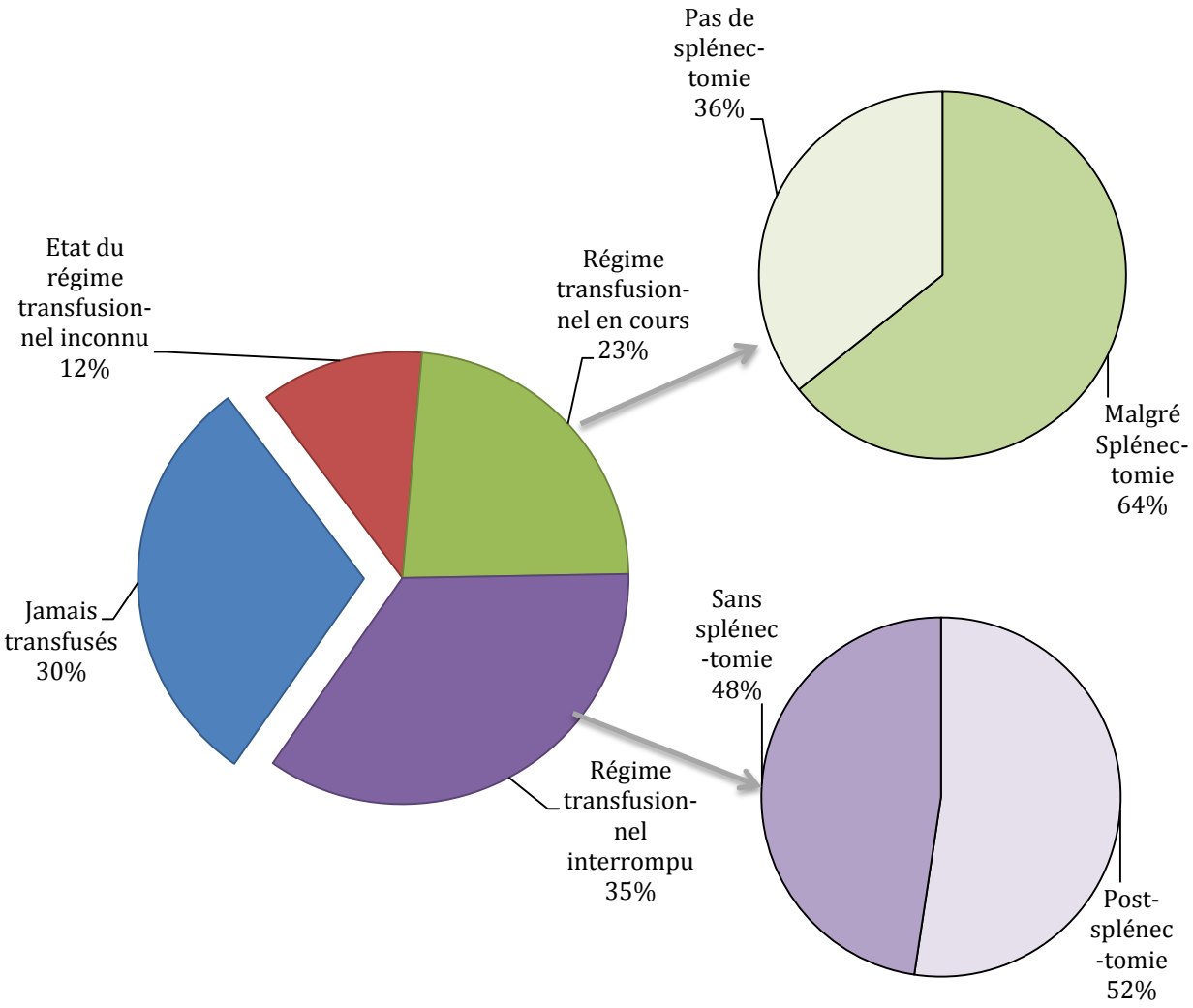


Figure 31 –*Besoins transfusionnels*

3.2.7.2. Splénectomie

Une splénectomie a été réalisée chez 25 patients, soit dans 40,3% des cas. Ce chiffre est à interpréter en fonction de l'âge. L'âge médian lors de l'intervention est de 9 ans (21 patients).

Nous n'avons des données biologiques en pré-splénectomie immédiate, puis à distance de la splénectomie, que pour seulement trois patients. Le régime transfusionnel de ces trois patients a pu être interrompu après splénectomie (voir *Tableau 17*)

Tableau 17–*Evolution du taux d'hémoglobine avant et après splénectomie*

	Cas 1 : ma03	**Cas 2 : bd10**	**Cas 3 : cr01**
Âge lors de la splénectomie	16 ans	9 ans	16 ans
Hémoglobine en pré-splénectomie (g/dL)	7,0	6	6,4
Hémoglobine post-splénectomie (g/dL)	8,2	8,5	8,7

Si on ne considère que ces trois cas, le gain moyen d'hémoglobine est de deux points après splénectomie.

Quatre patients sur les 21 individus splénectomisés ont présenté une thrombose veineuse profonde objectivée dans les suites de la splénectomie.

3.2.8. Complications

3.2.8.1. Lithiases biliaires (voir *Figure 32*)

Outre la surcharge martiale majorée par les transfusions et les épisodes thrombotiques veineux post-splénectomie, 27 patients (soit 45%), ont présenté un épisode de lithiase hépato-biliaire symptomatique à l'âge moyen de 16 ans, traitée par cholécystectomie à froid.

20 patients du groupe de phénotype sévère, et 6 patients du groupe de phénotype modéré ont présenté un épisode de lithiase biliaire objectivé.

Au sein du groupe « phénotypes mineurs », seul un patient (Cr12) a présenté une colique hépatique à l'âge de 69 ans. Cette complication aurait donc, dans la population de moindre sévérité, un caractère plus exceptionnel.

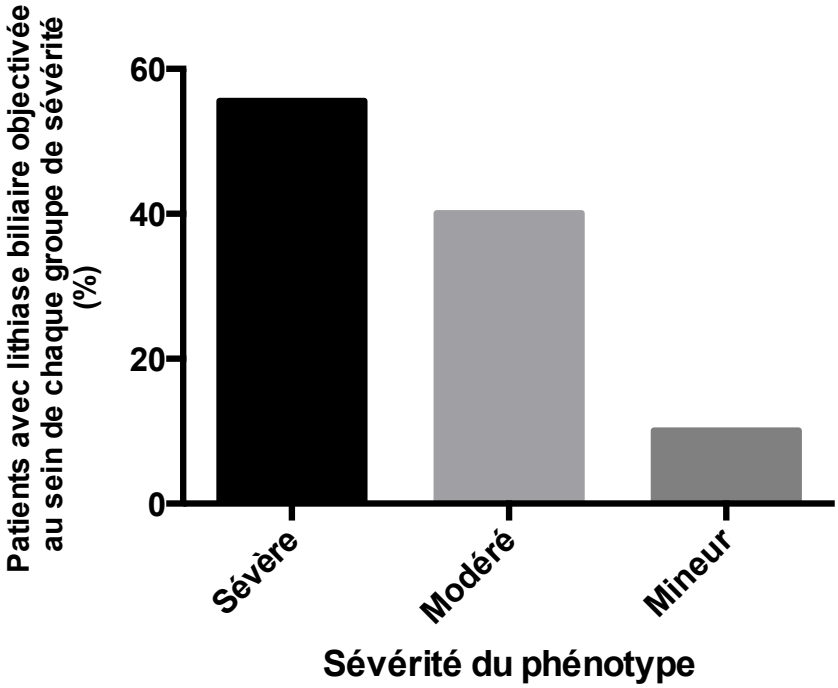


Figure 32–*Incidence des manifestations lithiasiques hépatobiliaires en fonction de la sévérité phénotypique (n=60, sévère=20/35, modéré=6/15 mineur=1/10)*

3.2.8.2. Surcharge martiale

La surcharge martiale du déficitaire en pyruvate kinase est à la fois résultante de l'hémolyse chronique mais aussi majorée et aggravée par les transfusions de culots globulaires.

3.2.8.2.1. Patients n'ayant jamais bénéficié de transfusion (*Tableau 18*)

Chez les patients non-transfusés, en l'absence de toute chélation ou de saignées, la ferritinémie médiane est de 136ng/mL (n=9).

Tableau 18 –*Estimation de la surcharge martiale chez les patients* ***non-transfusés et non-chélatés et non-saignés***

Patient	Âge du patient (années)	Taux actuel d'hémoglobine (g/dL)	Taux actuel de réticulocytes (G/L)	Ferritinémie (ng/mL) / date du dosage	Mesure IRM (micromol/g de foie sec) / date	Stratégie de prise en charge / date d'initiation	Atteinte d'organe
Tn01	1	9.6 (01/2013)	NC	NC	NR	Abstention	Non
Bd05	2	5.8 (01/2013)	252 (01/2013)	22.5 (01/2013)	NR	Abstention	Non
Ma02	3	11.8 (07/2012)	105 (07/2012)	NC	NR	Abstention	Non
Ni01	4	7.9 (04/2010)	NC	NC	NR	Abstention	Non
Di02	9	7.9 (10/2006)	454 (10/2006)	493 (10/2006)	NR	Abstention	Non
Di03	15	11 (02/2012)	213 (02/2012)	1192 (12/2011)	NR	Abstention	Non
Ma01	21	9.6 (05/2001)	160 (05/2001)	136 (03/2001)	NR	Abstention	Non
Cr04	23	7.8 (06/2011)	233 (06/2011)	50 (04/2009)	NR	Abstention	Non
Lc03	26	9.4 (11/2012)	238 (11/2012)	22 (12/2009)	NR	Abstention	Non
Cr15	27	13.2 (09/2007)	194 (09/2007)	355 (09/2007)	NR	Abstention	Non
Lc06	32	11.5 (02/2013)	136 (02/2013)	82 (02/2013)	NR	Abstention	Non
Cr05	43	12.9 (02/2006)	NC	NC	50 (03/2006)	Abstention	Non
Ro01	45	11.1 (06/2008)	126 (06/2008)	97 (06/2008)	NR	Abstention	Non
Cr08	52	12.5 (01/2003)	NC	212 (05/2003)	NR	Saignées depuis 1999	Non
Cr09	69	13.2 (09/2008)	188 (09/2008)	2390 (2000) 237 (09/2008)	160 (05/2005)	Saignées depuis 2005	Fibrose hépatique et diabète
Cr12	70	11.1 (03/2012)	NC	NC	NR	Saignées	Non

3.2.8.2.2. Patients transfusés

La ferritinémie culmine à 1326ng/mL (échantillon de 14 patients transfusés) avant toute chélation ou saignée dans le groupe des patients transfusés, puis diminue à 641,5ng/mL pour ces mêmes 14 patients après chélation ou saignées.

Parmi l'ensemble des patients transfusés, 30 sur 43 (soit 69,8%) bénéficient d'une chélation médicamenteuse (Exjade®, principalement, puis Desféral® ou Ferriprox®) dans la plupart des cas, ou de saignées, plus rarement. Le choix de la stratégie n'est pas uniforme en fonction des centres. L'âge moyen de prise en charge est de 21 ans.

Afin de monitorer la surcharge martiale, 15 patients ont bénéficié d'une IRM hépatique.

Sur le versant cardiaque, 14 patients ont bénéficié d'une IRM myocardique. Le résultat a toujours été supérieur à 20ms de T2*.

Les détails des résultats pour les patients transfusés, sont présentés dans les *Tableaux 19* à *23*.

3.2.8.2.3. Sévérité et surcharge martiale (*Figure 24*)

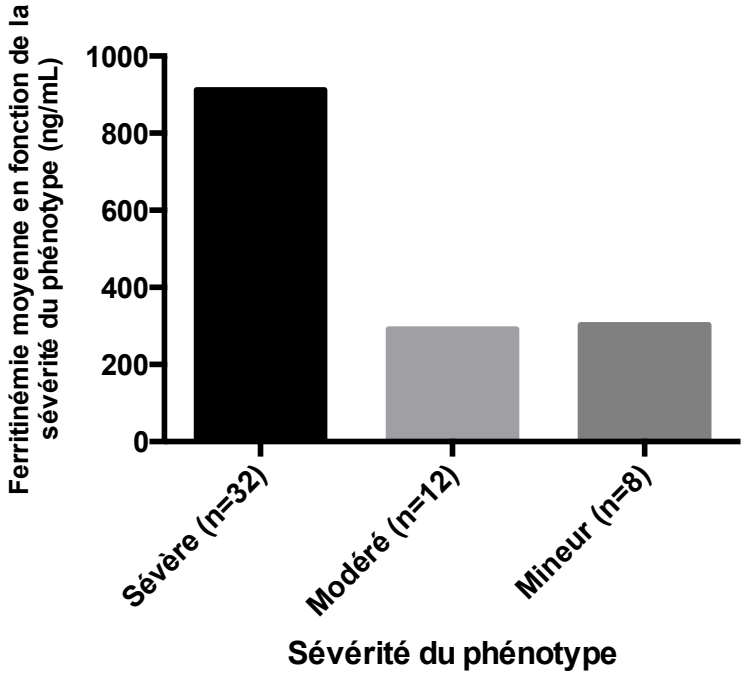


Figure 33 –*Ferritinémie moyenne en fonction de la sévérité du phénotype (n=52)*

Tableau 19 –*Estimation et prise en charge de la surcharge martiale chez les patients ayant bénéficié de* ***1 à 10 séances transfusionnelles***

Patient	**Âge du patient (années)**	**Nombre de séances de transfusions**	**Etat du régime transfusionnel et date d'interruption**	**Ferritinémie avant prise en charge (ng/mL) / date du dosage**	**Ferritinémie après prise en charge (ng/mL) / date du dosage**	**Mesure IRM (micromol/g de foie sec) / date**	**Stratégie de prise en charge / date d'initiation**	**Atteinte d'organe**
Kb01	3	1 à 10	Interrompu (01/2011)	148 (02/2013)	NA	NR	Abstention	Non
Bd06	4	1 à 10	Interrompu (03/2008)	48.4 (01/2013)	NA	NR	Abstention	Non
Bd03	15	1 à 10	Interrompu (1998)	105.2 (08/2012)	NA	NR	Abstention	Non
Bd01	18	1 à 10	Interrompu (2002)	44 (09/2008)	NA	NR	Abstention	Non
Cr16	22	1 à 10	Interrompu (1994)	742 (06/2012)	NA	180 (08/2012)	Abstention	Non
Ly02	29	1 à 10	Interrompu	NC	NC	NR	Abstention	Non
Bd07	40	1 à 10	Interrompu (05/1973)	391 (09/2012)	NA	NR	Abstention	Non
Ma08	66	1 à 10	NC	671 (10/2013)	NA	280 (10/2013)	Abstention	Non

Tableau 20 –*Estimation et prise en charge de la surcharge martiale chez les patients ayant bénéficié de* ***11 à 20 séances transfusionnelles***

Patient	**Âge du patient (années)**	**Nombre de séances de transfusions**	**Etat du régime transfusionnel et date d'interruption**	**Ferritinémie avant prise en charge (ng/mL) / date du dosage**	**Ferritinémie après prise en charge (ng/mL) / date du dosage**	**Mesure IRM (micromol/g de foie sec) / date**	**Stratégie de prise en charge / date d'initiation**	**Atteinte d'organe**
Di01	2	11 à 20	En cours	2366 (06/2012)	952 (07/2012)	NR	Chélation Exjade® (07/2012)	Non
Ma03	18	11 à 20	NC	260 (12/2012)	NA	NR	Abstention	Non
Ma05	22	11 à 20	NC	51 (01/2013)	NA	NR	Abstention	Non
Ro03	41	11 à 20	Interrompu	253 (10/2008)	284 (12/2010)	220 (11/2008)	Chélation Exjade® (11/2008)	Non

Tableau 21 –*Estimation et prise en charge de la surcharge martiale chez les patients ayant bénéficié de* ***21 à 100 séances transfusionnelles***

Patient	Âge du patient (années)	Nombre de séances de transfusions	Etat du régime transfusionnel et date d'interruption	Ferritinémie avant prise en charge (ng/mL) / date du dosage	Ferritinémie après prise en charge (ng/mL) / date du dosage	Mesure IRM (micromol/g de foie sec) / date	Stratégie de prise en charge / date d'initiation	Atteinte d'organe
Li01	6	>20	En cours	1413 (06/2010)	1233 (12/2012)	NR	Chélation Exjade® (08/2010)	Non
Cr13	7	11 à 20	En cours	16 (07/2011)	NA	NR	Abstention	Non
Ma04	8	>20	NC	1000 (03/2008)	550 (10/2012)	250 (08/2012)	Chélation Exjade® (03/2008)	Non
Lc01	10	>20	En cours	NC	856	NR	Chélation Exjade® (01/2007)	Non
Li02	15	>20	Interrompu (03/2004)	1492 (12/2002)	182 (01/2012)	NR	Chélateur NC (01/2003)	Non
Bd08	19	>20	En cours	NC	424 (12/2012)	NR	Chélation Desféral® (1996) puis Exjade®	Non
Cr01	40	>20	Interrompu (1978) puis 2004 et 2006 (grossesses)	891 (09/2009)	NA	220 (06/2009)	Abstention	Non
Ro05	42	>20	Interrompu (10/1996)	1870 (06/2011)	NA	NR	Abstention	Non

Tableau 22–*Estimation et prise en charge de la surcharge martiale chez les patients ayant bénéficié de* ***plus de 100 séances transfusionnelles***

Patient	Âge du patient (années)	Nombre de séances de transfusions	Etat du régime transfusionnel et date d'interruption	Ferritinémie avant prise en charge (ng/mL) / date du dosage	Ferritinémie après prise en charge (ng/mL) / date du dosage	Mesure IRM (micromol/g de foie sec) / date	Stratégie de prise en charge / date d'initiation	Atteinte d'organe
Bd09	2	>100	En cours	NC	390 (11/2012)	NR	Chélation Exjade®	Non
Lc02	11	>100	En cours	NC	303 (01/2013)	210,5 (08/2012)	Chélation Desféral®(02/2004) puis Exjade® (02/2006)	Non
Ly01	24	>100	En cours	5647 (10/2007)	9553 (08/2012)	NR	Chélation Desféral® (12/2007)	Non
Lc05	25	>100	En cours	NC	344 (08/2012)	69 (10/2012)	Chélation Exjade®	Non
Bd04	31	>100	Interrompu (1992)	1500 (11/2009)	288 (05/2012)	250 (02/2011)	Chélation Exjade® (10/2009)	Non
Ro02	33	>100	Interrompu (07/2009)	NC	630 (11/2008)	290 (06/2009)	Chélation Exjade®(07/2009)	Hypothyroidie

Tableau 23 (1/2)– *Estimation et prise en charge de la surcharge martiale chez les patients ayant bénéficié d'un nombre de séances transfusionnelles non-précisé*

Patient	Âge du patient (années)	Nombre de séances de transfusions	Etat du régime transfusionnel et date d'interruption	Ferritinémie avant prise en charge (ng/mL) / date du dosage	Ferritinémie après prise en charge (ng/mL) / date du dosage	Mesure IRM (micromol/g de foie sec) / date	Stratégie de prise en charge / date d'initiation	Atteinte d'organe
Ih01	3	NC	NC	NC	53 (11/2011)	NR	NC	Non
Tl01	9	NC	Interrompu (01/2012)	1322 (05/2007)	513 (05/2012)	270 (11/2011)	Chélation Exjade® (04/2012)	Non
Bd10	12	NC	NC	NC	350 (03/2011)	200 (08/2009)	Chélation Desféral®	Non
Cr07	23	NC	En cours	6730 (10/2007)	1360 (10/2010)	240 (09/2008)	Chélation Desféral® puis Exjade®	Non
Cr10	30	NC	En cours	1200 (05/2008)	1400 (08/2009)	NR	Chélation Desféral® (2008) puis Exjade® (2009)	Non
Lc06	32	NC	NC	82 (02/2013)	NA	NR	Abstention	Non
Cr03	39	NC	Interrompu	968 (06/2011)	891 (12/2011)	170 (02/2012)	Saignées (2005-2007) puis chélation Exjade® (02/2011)	Non
Cr06	40	NC	Interrompu (1973)	331.8 (03/2005)	NA	NR	Abstention	Non

Tableau 23 (suite, 2/2)–*Estimation et prise en charge de la surcharge martiale chez les patients ayant bénéficié d'un nombre de séances transfusionnelles non-précisé*

Patient	Âge du patient (années)	Nombre de séances de transfusions	Etat du régime transfusionnel et date d'interruption	Ferritinémie avant prise en charge (ng/mL) / date du dosage	Ferritinémie après prise en charge (ng/mL) / date du dosage	Mesure IRM (micromol/g de foie sec) / date	Stratégie de prise en charge / date d'initiation	Atteinte d'organe
Cr14	47	NC	En cours	1330 (2006)	733 (12/2008)	NC	Chélation Desféral® (2006) puis Exjade® (2007)	Myocardiopathie dilatée
Cr02	49	NC	Interrompu (2008)	116 (2005)	NA	NR	Abstention	Non
Cr11	56	NC	Interrompu (1960)	NC	3580 (01/2009)	350 (10/2008)	Chélation Exjade®	Non
Ma06	58	NC	Interrompu (1972)	NC	253 (10/2012)	270 (06/2006)	Chélation Desféral® puis Exjade®	Hypogonadisme

3.2.8.3. Autres complications

- Une érythroblastopénie aiguë virale a été objectivée chez 9 patients à l'âge moyen de 12,4 ans.

- Un retard staturo-pondéral est consigné dans le dossier de 5 patients, avec une cassure de courbe à 10,8 ans en moyenne.

- Un hypogonadisme a été diagnostiqué dans 6 cas :
    - Isolément pour 2 patients
    - Associé à un retard de croissance staturo-pondéral dans un cas
    - Associé à un retard de croissance staturo-pondéral et à un diabète
    - Associé à une hypothyroïdie
    - Hypogonadisme secondaire et ostéoporose objectivée chez la dernière patiente

Les patients du groupe sévère nécessitent un régime transfusionnel important, puisque 69,4% d'entre eux ont bénéficié de plus de 20 séances et plus de 100 séances pour 34,8% d'entre eux.

Les besoins transfusionnels du groupe modéré sont plus limités, jusqu'à 10 séances au maximum pour 67% des patients. En effet, si certains nécessitent un support régulier, une majorité bénéficie d'appoints ponctuels (grossesse, érythrobastopénie à parvovirus B19).

PARTIE 4 : Discussion, limites, perspectives

Mis en évidence en 1961, le déficit en PK est la première cause d'anémie hémolytique congénitale non-spherocytaire. Depuis, environ 600 cas ont été décrits dans la littérature et plus de deux cent vingt mutations distinctes ont été rapportées. La conséquence du déficit est une anémie hémolytique, et une accumulation de métabolites intermédiaires de la glycolyse (en particulier le 2,3-BPG).

Le degré d'hémolyse est variable, allant d'une discrète anémie à des formes létales in utero ou dans les premiers mois de vie.

Les premiers résultats de la cohorte "CODE PK" exposés précédemment, présentant 60 déficitaires suivis sur le territoire français, seront ici discutés et mis en perspective avec les données de la littérature.

4.1. Diversité de la présentation clinico-biologique du déficit en PK et stratégies de prise en charge

4.1.1. Une pathologie ubiquitaire sous-diagnostiquée

D'un point de vue clinique et biologique, les résultats présentés sont cohérents avec les données de la littérature. En effet, la présentation du déficit est extrêmement variable, avec une distribution de l'âge au diagnostic qui est par conséquent très large [J0-62 ans].

Nous avons recensé des formes très sévères du nouveau-né avec un recours immédiat aux transfusions et un régime transfusionnel régulier ultérieur, et le plus souvent une splénectomie. Mais d'autres patients sont diagnostiqués plus tardivement et présentent des formes très mineures qui auraient pu n'être jamais objectivées.

De fait, il est permis de supposer que le déficit en PK est largement sous-diagnostiqué, et que des cas appartenant au groupe « phénotype mineur », dont l'effectif est le plus faible, sont méconnus du fait de présentations cliniques peu symptomatiques voire asymptomatiques. En outre, ce postulat est appuyé par Beutler et al. qui estiment la prévalence l'homozytie ou de l'hétérozygotie composite à 51 par million d'individus (40), ce qui porterait le nombre de déficitaires en PK en France à 3300 patients en extrapolant.

4.1.2. Présentations cliniques

La triade ictère-splénomégalie-pâleur est souvent retrouvée chez les 60 patients que nous présentons et constitue la présentation classique du déficit (79). Au contraire, leurs parents, hétérozygotes pour une mutation de *PKLR*, sont porteurs sains et ne présentent aucun signe clinique ou biologique, à l'exception d'une activité abaissée de la PK intraérythrocytaire.

Chez l'adulte, le tableau clinique et le taux d'hémoglobine sont relativement stables. Seuls une pathologie intercurrente, souvent virale (principalement les infections à parvovirus), ou une grossesse peuvent provoquer un effondrement inhabituel de l'hémoglobine et nécessiter une prise en charge intensifiée.

4.1.3. Variation des paramètres biologiques

Le profil biologique du déficitaire en PK a les mêmes caractéristiques que dans d'autres pathologies avec hémolyse chronique non-sphérocytaire :

- Anémie plus ou moins importante, [4,7-13,2 g/dL] dans notre cohorte
- Augmentation du taux de réticulocytes
- Stigmates biochimiques d'hémolyse : hyperbilirubinémie, haptoglobine effondrée, augmentation de la LDH plasmatique

Le taux de réticulocytes des patients non-splénectomisés est généralement augmenté, mais la réticulocytose n'est pas proportionnelle à la gravité de l'hémolyse. En effet, une des spécificités du déficit en PK est une séquestration splénique des réticulocytes et leur destruction par le système réticuloendothélial (94,95). Par conséquent, la splénectomie provoque une hausse significative des réticulocytes (voir *Figure 34*).

La bilirubinémie non-conjuguée est très souvent augmentée. Pour des valeurs très élevées, une maladie de Gilbert coexistante doit être recherchée. Dans notre série, tous les patients ont bénéficié d'un génotypage du gène UGTA1. 5 étaient homozygotes 7/7 (Ma02, Cr01, Tl01, Cr02 et Cr16) :

- 5/5 patients ont présenté un ictère néonatal persistant
- 4/5 patients ont présenté un événement clinique aigu lié à une lithiase biliaire

Pour ces 5 patients, homozygotie 7/7 entraîne un biais de confusion clinique sur l'ictère et les événements lithiasiques et biologique, sur la bilirubinémie.

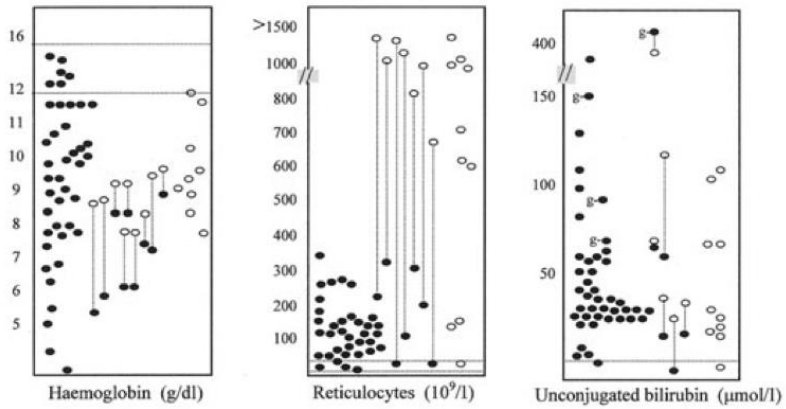


Figure 34– *Paramètres biologiques de patients déficitaires en PK de la cohorte italienne*
Les ronds noirs sont des données avant splénectomie et les ronds blancs, après splénectomie. Les trais verticaux indiquent les variations pré/post-splénectomie pour un même patient *(Zanella et al., Br. J. Haematol., 2000(58)).*

En raison du manque de spécificité du tableau clinique et biologique, le diagnostic ne peut être posé qu'après mesure de l'activité enzymatique et génotypage. L'activité enzymatique doit être interprétée avec prudence, pouvant être faussement normale voire augmentée (65,96). Il est établi que la corrélation entre la diminution d'activité enzymatique mesurée d'une part et l'importance de l'hémolyse et de la réticulocytose d'autre part, ne peut être établie (97). En effet, le résultat de l'activité doit être interprété avec prudence :

- Risque de contamination par des globules rouges transfusés
- Déleucocytation incomplète
- Persistance compensatoire de l'isoenzyme PK-M2 (98)
- Activité enzymatique effondrée in vivo, mais conservée in vitro dans des conditions optimales (notamment concentration en PEP) (64)

4.1.4. Situations de décompensation

4.1.4.1. Infection virale à Parvosvirus B19

Dans certains cas, l'anémie érythroblastopénique liée au parvovirus B19 peut révéler le déficit en PK. Dans notre série, au moins neuf patients sur soixante ont présenté une érythroblastopénie objectivée à parvovirus B19.

Chez les sujets immunocompétents, non-anémiés ultérieurement, le parvovirus B19 induit une érythroblastopénie aiguë et transitoire peu bruyante. Chez le patient déficitaire en PK, et de façon non-spécifique, l'érythroblastopénie induite par le parvovirus B19 entraîne une anémie brutale et profonde (99) :

- L'altération de la durée de vie des hématies ne permet pas de tolérer l'arrêt transitoire de l'érythropoïèse
- Le caractère très érythroblastique de la moelle du déficitaire en PK, accroît l'impact lytique du parvovirus B19

4.1.4.2. Grossesse et déficit en PK

La grossesse est en général, bien tolérée, malgré un besoin transfusionnel accru. Le déroulement de l'accouchement et les suites de couches sont plutôt favorables (100). Des transfusions régulières sont souvent prescrites pour maintenir l'hémoglobine aux alentours de 8g/dL. La problématique de l'anémie hémolytique liée au déficit en PK au cours de la grossesse est principalement le retard de croissance fœtal in utero (101,102). Cette complication dont la physiopathologie n'est pas totalement expliquée à ce jour, reste exceptionnelle dans cette pathologie.

4.1.5. Mort fœtale in utero et décès consécutifs au déficit

La mortalité imputable au déficit survient principalement in utero, où de rares hydrops foetalis ont été rapportés (103,104), et dans les premiers mois de vie.

Dans notre série, *Bd11*, est décédée au troisième mois de vie dans un contexte de défaillance hépatique avec ascite.

Deux cas reportés de nouveaux-né porteurs de deux mutations de *PKLR* et décédés de défaillance hépatique aux Pays-Bas (105), sont très semblables à la présentation clinique, biologique et histologique de *Bd11*.

Ces trois cas sont exposés dans le *Tableau 24*.

Tableau 24–*Présentation de trois cas avec décès d'un nourrisson déficitaire en PK*

	Bd11 (série Code PK)	**Cas 1 littérature (105)**	**Cas 2 littérature (105)**
Présentation clinique	• 3ème enfant d'un couple non-consanguin • Aînée déficitaire en PK • Accouchement voie basse à terme • Hépatomégalie, hypertension portale, ascite, coagulopathie • Myocardiopathie hypertrophique • Décès à 3 mois de vie	• Accouchement par voie basse à terme • Ictère • Pâleur cutanéomuqueuse • Splénomégalie • Coagulopathie • Ascite • Décès à 5 mois d'une défaillance multiviscérale	• Accouchement par voie basse à terme • Ictère • Hépatosplénomégalie • Coagulopathie • Décès à 4 mois d'une défaillance multiviscérale
Taux Hb (g/dL) à la naissance	5,1	9,7	12,6
Taux de réticulocytes (G/L) à la naissance	888	208	174
Bilirubinémie (micromoles/L) à la naissance	NC	283,9	392,7
ASAT/ALAT (U/L)	315/102	546/104	496/178
Activités PK/HK (U/gHb)	NR	7,4 (N=6,9-14,5)/ 2,16 (N=1,02-1,58)	3,7 (N=4,3-9,6)/ Activité HK augmentée
Histologie hépatique	Fibrose septale disséquante et cirrhogène, cholestase intrahépatique sévère et hépatosidérose majeure	Fibrose et nécrose hépatiques, surcharge martiale importante	Cholestase massive et surcharge martiale importante

Dans les trois cas présentés de décès de nourrissons, l'anatomie pathologique objective des lésions hépatiques à type de fibrose, de nécrose dans un contexte de surcharge martiale majeure. Ces descriptions posent le problème de l'atteinte hépatique au cours du déficit en PK intraérythrocytaire, et de la relation entre altérations de PK-R et de PK-L.

4.1.6. Manifestations hépatiques

Une mutation de *PKLR* altère aussi bien les isoenzymes PK-R intraérythrocytaire, que PK-L intrahépatique (69). Cependant, le tableau clinique se limite à un faisceau de manifestations consécutives à l'hémolyse. En effet, la part d'insuffisance hépatocellulaire résultant du déficit en PK-L est compensée par une persistance de synthèse de l'enzyme dans les hépatocytes (106) et par l'énergie apportée par le métabolisme aérobie.

Des travaux (107) ont objectivé chez des déficitaires en PK intraérythrocytaire sans dysfonction hépatique, que l'activité de la PK hépatique n'était pas assurée par l'isoenzyme PK-L, altérée suite à la mutation de *PKLR* et absente du tissu hépatique. L'isoenzyme embryonnaire PK-M2 était en revanche surexprimée et compensait le déficit.

Cependant, la dysfonction hépatique du patient déficitaire en PK est le résultat d'une combinaison de mécanismes physiopathologiques allant de la non-compensation du déficit en PK-L par PK-M2, à des atteintes hépatiques imputables à l'accumulation intrahépatique du fer résultante de l'hémolyse chronique. La défaillance hépatique reste néanmoins exceptionnelle.

4.1.7. Surcharge martiale

4.1.7.1. Physiopathologie

Chez les patients transfusés mais aussi non-transfusés, une chélation médicamenteuse du fer peut être proposée en fonction du degré de surcharge martiale estimé par mesure de la ferritinémie et/ou du coefficient de saturation de la transferrine, ou mesuré par IRM hépatique et cardiaque. Certaines équipes ont recours aux saignées.

La surcharge martiale est souvent le paramètre qui détermine le pronostic des patients déficitaires en PK. En effet, ces patients sont à risque d'hémochromatose. Chez les patients non-transfusés de la série présentée, 5/11 (ferritinémie disponible) ont une ferritinémie augmentée.

En effet, le déficit en PK abrège la survie des globules rouges et l'hémolyse chronique provoque une accumulation de fer, qui est aggravée par une érythropoïèse inefficace au niveau des précurseurs érythrocytaires médullaires (50). La surcharge est habituellement progressive et souvent majorée par des transfusions.

Plusieurs travaux indiquent que l'hyperéythropoïèse du déficitaire en PK entraine un échappement très précoce à la régulation physiologique par l'hepcidine.

L'hepcidine est sécrétée lorsque les réserves en fer de l'organisme sont suffisantes, et se lie à la ferroportine membranaire (tyrosine kinase) des enterocytes induisant son internalisation et sa dégradation (108) afin de réduire l'absorption du fer (voir *Figure 35*).

Dans le cadre d'une érythropoïèse intense, une hypersécrétion médullaire (principalement érythroblastique) du Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) antagonise l'action de l'hepcidine, et favorise la surcharge martiale (109,110).

Finkenstedt et al. (111) ont étudié la relation entre surcharge martiale et érythropoïèse excessive chez 22 patients déficitaires en pyruvate kinase. Le niveau d'hepcidine sérique était treize fois plus bas chez les patients déficitaires en PK que chez les sujets sains et le taux de GDF15 était au contraire bien plus élevé. Ces conclusions permettent de penser que l'excès de sécrétion de GDF15 est impliqué dans la surcharge martiale des déficitaires en PK.

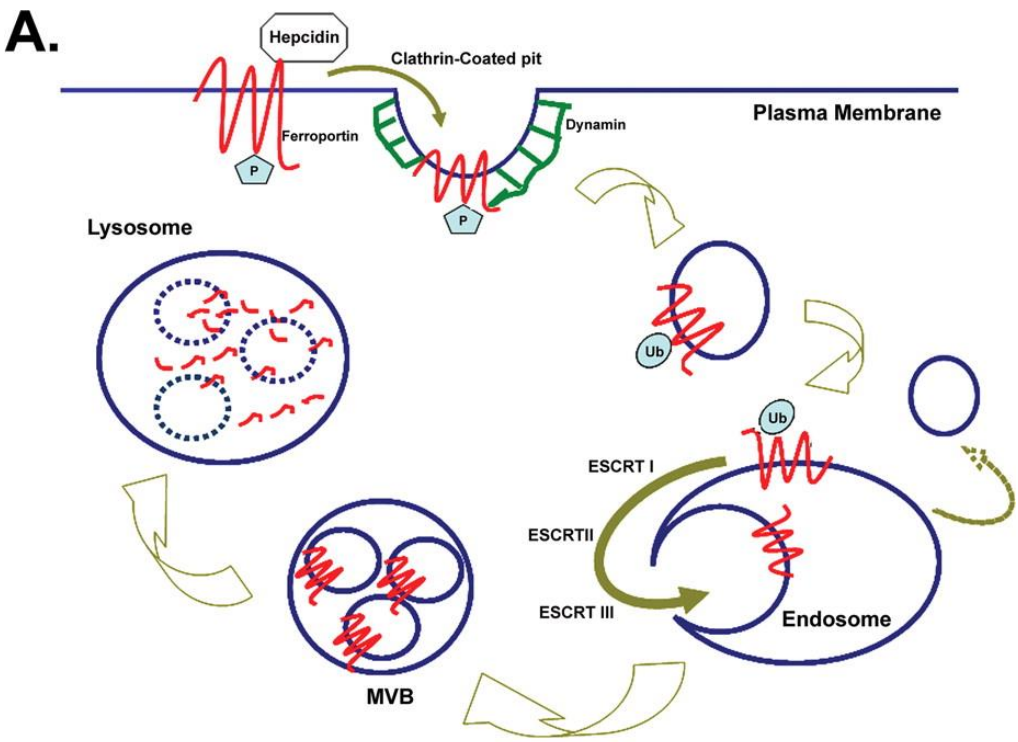


Figure 35 - *Mécanisme de régulation par l'hepcidine, de l'expression membranaire de la ferroportine*
*(*Source : De Domenico et al. Mol Biol Cell. 2007 (112))

Les autres facteurs de risque de la surcharge martiale sont :

- Les transfusions répétées
- La splénectomie (113)
- Les mutations de HFE associées

4.1.7.2. Suivi et stratégies de prise en charge

Le suivi régulier des ferritinémies est fondamental. En effet, une unique mesure de la ferritinémie est insuffisante, puisque de nombreux facteurs peuvent entrainer des variations, notamment les syndromes inflammatoires.

En l'absence de recommandations spécifiques pour le patient déficitaire en PK, il est possible de se référer au guide "ALD n° 10 portant sur les syndromes thalassémiques majeurs et intermédiaires", (114) édité par la HAS. Le traitement chélateur du fer est débuté après 10 à 20 transfusions ou lorsque la ferritinémie dépasse 1 000 ng/ml. Son but est de maintenir des concentrations tissulaires en fer n'induisant pas de lésions cellulaires. En pratique, il est recommandé de maintenir des ferritinémies sous traitement chélateur inférieures ou égales à 1000 ng/mL.

La majorité des patients de notre cohorte bénéficiant d'une chélation médicamenteuse, reçoivent du Déférasirox (Exjade®).

Les différentes molécules de chélation disponibles actuellement sont présentées dans le *Tableau 25*.

Tableau 25 – *Présentation comparative des molécules disponibles pour la chélation martiale* (Source : Guide HAS "*syndromes thalassémiques majeurs et intermédiaires*" (114))

	Déféroxamine (Desféral®) 20-60 mg/kg/jour	Défériprone (Ferriprox®) 50-100 mg/kg/jour en 3 prises	Déférasirox (Exjade®) 10-30 mg/kg/jour en 1 seule prise
Voie	SC, IV, IM	*Per os*	*Per os*
Demi-vie	20 minutes	3 heures	8-16 heures
Excrétion	Urines + selles	Urines	Selles
Action sur les ferritinémies	+++	+++	+++
Action sur la CFH	+++	+	+++
Action sur le fer cardiaque	+	+++	Évaluation en cours
Toxicité	Locale (voie SC) Neurosensorielle Croissance Infections à *Yersinia* et *Klebsiellla sp.*	Agranulocytose Articulaire Digestive Hépatique	Rénale Cutanée Digestive Hépatique
Statut 2007 (AMM dans le cadre de la TM)	Surcharge martiale post-TF	Surcharge martiale post-TF des patients âgés de plus de 10 ans si DFO contre-indiquée ou inadéquate	Surcharge martiale post-TF des patients âgés de plus de 6 ans sous TF systématiques En cas de DFO contre-indiquée ou inadéquate si âgeentre 2 et 6 ans ou moins transfusés

4.2. Génotypes et sévérité clinique

Afin de tenter de corréler les mutations rapportées avec le phénotype clinique et biologique, les patients ont été répartis dans trois groupes dont nous rappelons les critères :

- **Déficit sévère :**
  - Taux d'hémoglobine inférieur à 8 g/dL
  - Et/ou Patient splénectomisé
  - Et/ou régime transfusionnel en cours
- **Déficit modéré :**
  - Taux d'hémoglobine compris entre 8 et 10 g/dL
  - Et/ou support transfusionnel ponctuel
  - Et absence de splénectomie
- **Déficit mineur :**
  - Taux d'hémoglobine supérieur à 10 g/dL
  - Et aucune transfusion
  - Et absence de splénectomie

4.2.1. Types de mutations en fonction de la sévérité

Le génotypage a supplanté les méthodes historiques d'enzymologie sur lesquelles reposaient des classifications tentant de corréler activiét enzymatique et phénotype. Les conséquences biochimiques et cliniques des mutations de PK sont à présentété obtenues par étude de patients homozygotes et, dans une moindre mesure, de l'étude de plus grande série d'hétérozygotes composites regroupés en fonction de leur phénotype clinique (58).

Plus récemment, l'étude de PK mutantes humaines recombinantes a permis de définir l'impact des remplacements d'acides aminés sur la stabilité et les propriétés cinétiques (27,29,97).

Les mutations faux-sens impactant directement le site actif ou la stabilité de l'enzyme, les mutations non-sens, frameshift, des sites d'épissage et les délétions larges sont plutôt associées à des phénotypes sévères (79). Dans notre cohorte (voir *Figure 36*) :

- Les mutations sont majoritairement faux-sens, quelque soit le niveau de sévérité
- Les mutations des sites d'épissage ne sont pas exclusivement retrouvées dans le groupe sévère
- Les mutations non-sens sont retrouvées à fréquence comparable dans les trois groupes
- Les mutations frameshift sont exclusivement dans le groupe sévère
- Les mutations du promoteur sont exclusivement dans le groupe mineur

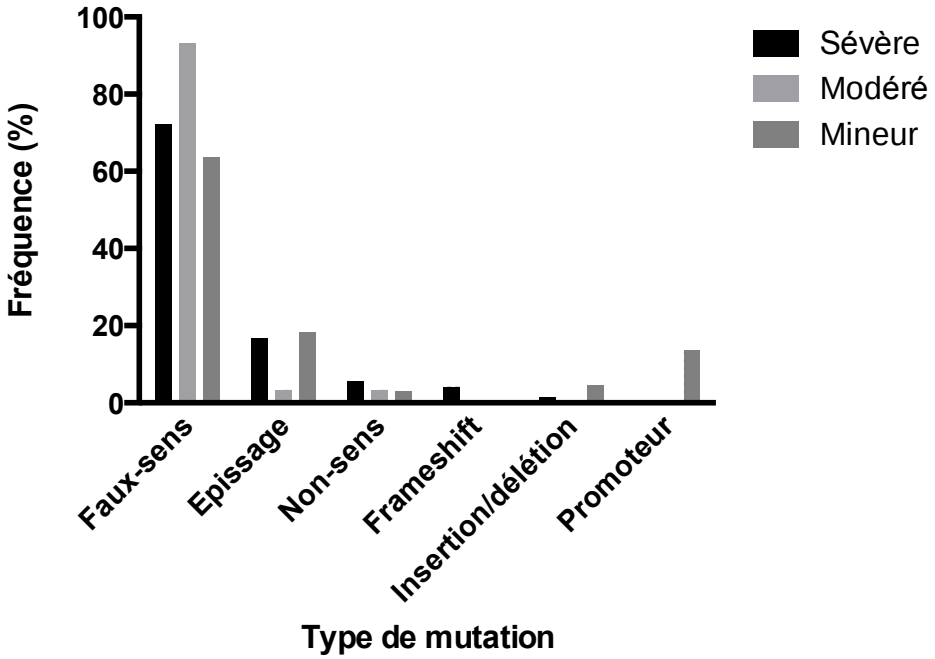


Figure 36 – *Types de mutations en fonction de la sévérité du phénotype*

Il est difficile de prédire les effets in vivo des associations de mutations faux-sens. En effet, l'hétérozygotie composite pour deux mutations faux-sens disctinctes de *PKLR*, implique la coexistence de deux monomères différents, dont les propriétés diffèrent. Ainsi, plusieurs populations de tétramères sont présentes dans des proportions diverses avec des propriétés cinétiques, allostériques et structurelles différentes pour un même individu.

L’étude des mutations montre que la plupart des faux-sens interviennent dans des points chauds de la protéine :

- Les interfaces interdomaines A/C et A/A’
- Le noyau hydrophobe du domaine A
- Le site de liaison du 1,6-FDP sur le domaine C

La littérature rapporte des cas de déficit en PK dans toutes les régions du Monde. Les tableaux cliniques et biologiques comportent les mêmes observations (notamment la variabilité de la présentation). En revanche, la prévalence des différentes mutations diffère, en fonction des territoires et des flux migratoires. Ainsi, les mutations les plus fréquentes ne sont pas les mêmes sur les différents continents (37,75,83,86,88,115–124) (pour l’Europe, voir *Figure 37*) :

- p.Arg510Gln est très fréquente aux USA, dans l’Europe du nord et l’Europe centrale
- p.Arg486Trp est très commune en Europe du sud (Italie, Espagne, Portugal) : p.Arg510Gln est très rare dans ces 3 pays
- p.Arg490Trp est fréquente en Asie
- p.Glu241Stop et p.Gly332Ser sont relativement fréquente dans la population blanche, de façon ubiquitaire
- Seules p.Thr384Met et p.Arg479His sont communes à la population Japonaise et occidentale

Dans notre cohorte, les 2 mutations faux-sens p.Arg510Gln, associée majoritairement à des phénotypes sévères, et p.Arg486Trp, associée majoritairement à des phénotypes modérés, se distinguent particulièrement.



Figure 37 - *Répartition géographique des principaux variants en Europe*

● ○ p.Arg510Gln ; ☆ ★ p.Arg486Trp ; ◆ ◇ p.Glu241Stop ; ⧗ ⧖ p.Glu172Gln ; ▲ △ p.Gly332Ser. Les formes « noires », correspondent à une homozygotie ; Les formes « blanches » correspondent à une hétérozygotie composite
(Source : Zanella et al., *Clinical Haematology*, 2000 (58))

4.2.2. p.Arg510Gln

Cette mutation est retrouvée 17 fois dans notre série :

- 11 fois à l'état hétérozygote composite
- 3 fois à l'état homozygote pour cette mutation.

Tous les patients porteurs ont été diagnostiqués avant l'âge de 5 ans le phénotype est plutôt sévère (*Figure38*) :

- 79% présentent un phénotype sévère
- 21% ont un phénotype modéré
- Aucun de ces patients ne présente un phénotype mineur

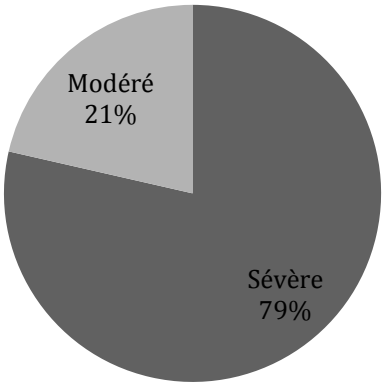


Figure 38 – *Phénotypes associés à une mutation p.Arg510Gln*

Mutations en association à p.Arg510Gln, donnant un phénotype sévère :

- **p.Arg510Gln exon 11 (2 cas)**
- p.Asn393Ser exon 9
- p.Arg532Trp exon11
- p.Arg408stop
- p.Glu241X exon 7
- p.Arg479His exon 10+splice
- p.Ser120Phe exon 4
- p.Gly232Ser exon11/splice
- p.Thr371Ile exon 8
- ivs 11 +1G>C

Mutations en association à p.Arg510Gln, donnant un phénotype modéré :

- **p.Arg510Gln exon 11 (1 cas)**
- p.Glu172Gln exon 6
- p.Lys365Met exon 8

p.Arg510Gln affecte l'interface A/C de la pK. A l'état homozygote, l'activité résiduelle de la PK est très basse, (10% à 25% de l'activité normale) (29).

p.Arg510Gln est la mutation la plus fréquente en Europe du Nord (58) (voir *Figure 34*). Cette PK mutante conserve sa capacité de liaison avec ses ligands (PEP et ADP) et peut être régulée allostériquement par le fructose 1,6-bisphosphate de façon normale. En outre, ses propriétés cinétiques sont identiques à celles de la PK sauvage (voir *Figures 39* et *40*). En revanche, elle est plus sensible à l'inhibition par l'ATP et surtout sa thermostabilité est très altérée. Cette instabilité provoque donc une diminution de sa concentration intraérythrocytaire (29).

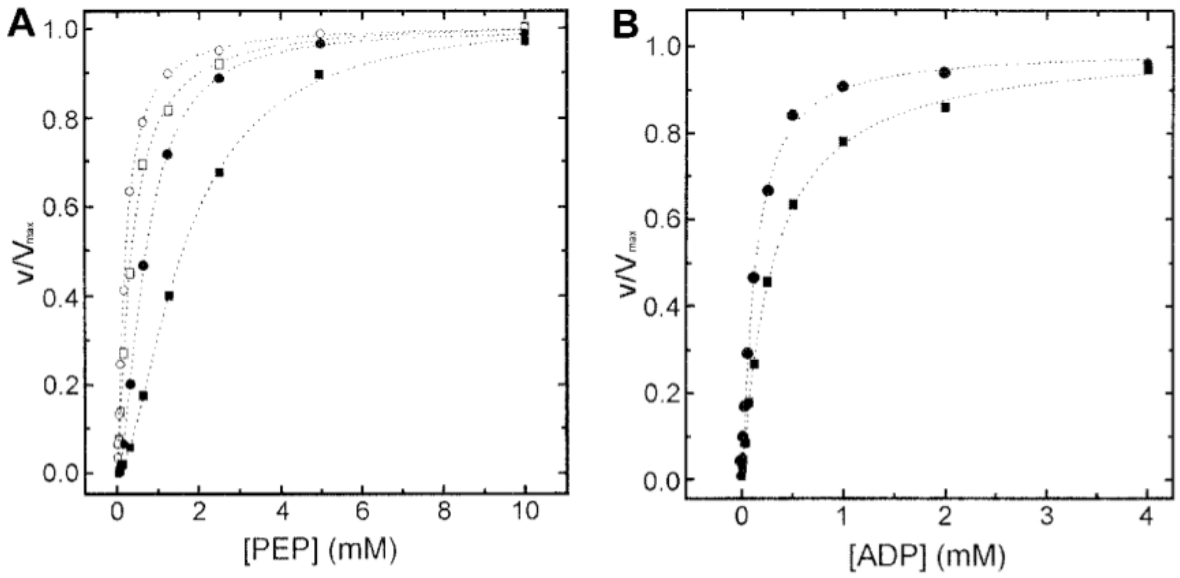


Figure 39 – *Comparaison des propriétés du mutant p.Arg510Gln et de la PK sauvage*

Source : Wang et al., Blood, 2001 (29)

(A) Propriétés cinétiques à 37°C de la PK sauvage (ronds), et du mutant p.Arg510Gln (carrés) en fonction de la concentration en PEP. Carrés et ronds blancs=présence de FBP dans le milieu ; Carrés et ronds noirs=absence de FBP.

(B) Propriétés cinétiques à 37°C de la PK sauvage (ronds), et du mutant p.Arg510Gln (carrés) en fonction de la concentration en ADP.

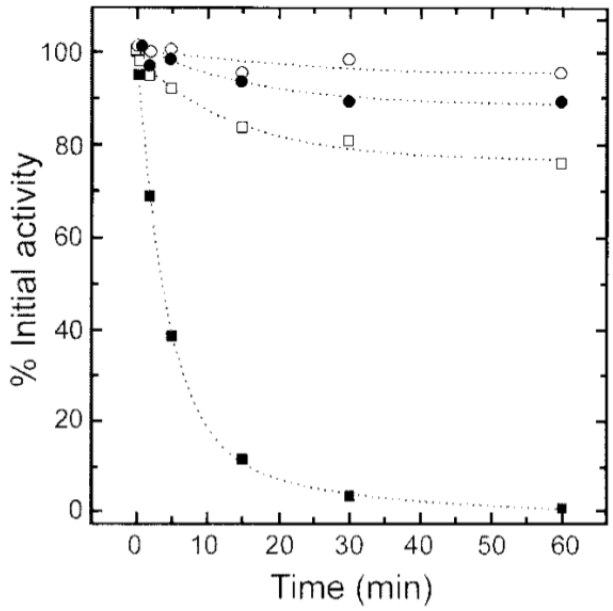


Figure 40 – *Comparaison des thermostabilités de la PK sauvage et du mutant p.Arg510Gln après incubation à 53°C*

Source : Wang et al., Blood, 2001 (29)

Propriétés cinétiques à 37°C de la PK sauvage (ronds), et du mutant p.Arg510Gln (carrés) en fonction de la concentration en PEP. Carrés et ronds blancs=présence de FBP dans le milieu ; Carrés et ronds noirs=absence de FBP.

Parmi les patients homozygotes pour la mutation p.Arg510Gln, l'enfant Kb01 âgé actuellement de 3 ans et diagnostiqué à 5 mois devant un ictère et une pâleur néonataux, présente une forme modérée de la maladie. Son taux d'hémoglobine habituel est de l'ordre de 10g/dL, avec une bonne tolérance clinique.

Cette forme modérée chez un homozygote p.Arg510Gln est peu commune et cette présentation peut être expliquée par des variations métaboliques ou protéolytiques modulant l'impact de l'altération de l'enzyme, voire à une persistance compensatrice de l'isoenzyme PK-M2 (72,79).

4.2.3. p.Arg486Trp

La mutation la plus fréquente associée à un phénotype modéré dans notre série est p.Arg486Trp, située également à l'interface A/C.

Elle est retrouvée 20 fois, chez 20 patients tous hétérozygotes composites, avec un diagnostic posé à des âges variables (1er jour de vie à 62 ans), devant des présentations de sévérité plus modérées (*Figure 41*) :

- 10 patients ont un phénotype modéré
- 8 patients présentent un phénotype sévère
- 2 patients sont de phénotype mineur

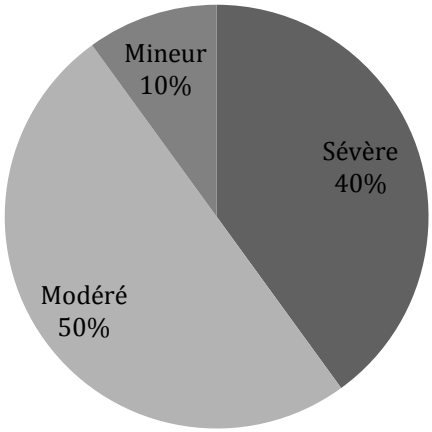


Figure 41 – *Phénotypes associés à une mutation p.Arg486Trp*

Mutations en association à p. p.Arg486Trp, donnant un phénotype sévère :

- **p.Asn393Ser exon 9 (3 cas)**
- p.Asn393Lys exon 9
- p.Glu318del exon 7
- p.Arg337Trp exon 8
- p.Thr371Ile exon 8
- p.Val349Phe exon 8

Mutations en association à p.Arg510Gln, donnant un phénotype modéré :

- p.Gly411Asp exon 9 (2 cas)
- p.Tyr408Ile exon 9 (2 cas)
- p.Gly358Arg exon 8
- p.Glu318* exon 7
- p.Asn393Ser exon 9
- p.Gln421Arg exon 9
- p.Gly319Asp exon 7
- p.Arg337Trp exon 8

Mutations en association à p.Arg510Gln, donnant un phénotype mineur :

- p.Gly159Val exon 5
- p.Arg293Glu exon 7

Les données cliniques et biologiques des patients au phénotype plutôt modéré sont cohérentes avec l'impact relatif de cette mutation sur la structure de la protéine.

L'arginine en position 486 est liée à une leucine en position 362 (en position C-terminale du domaine A) par un pont hydrogène. La structure et les propriétés fonctionnelles du mutant p.Arg486Trp sont pourtant peu affectées par la perte de l'arginine au profit d'un tryptophane, qui établit également une liaison avec la leucine en position 362 (voir *Figures 42 et 43*). Des études sur ce variant ont montré une stabilité supérieure à celle de la PK sauvage (97).

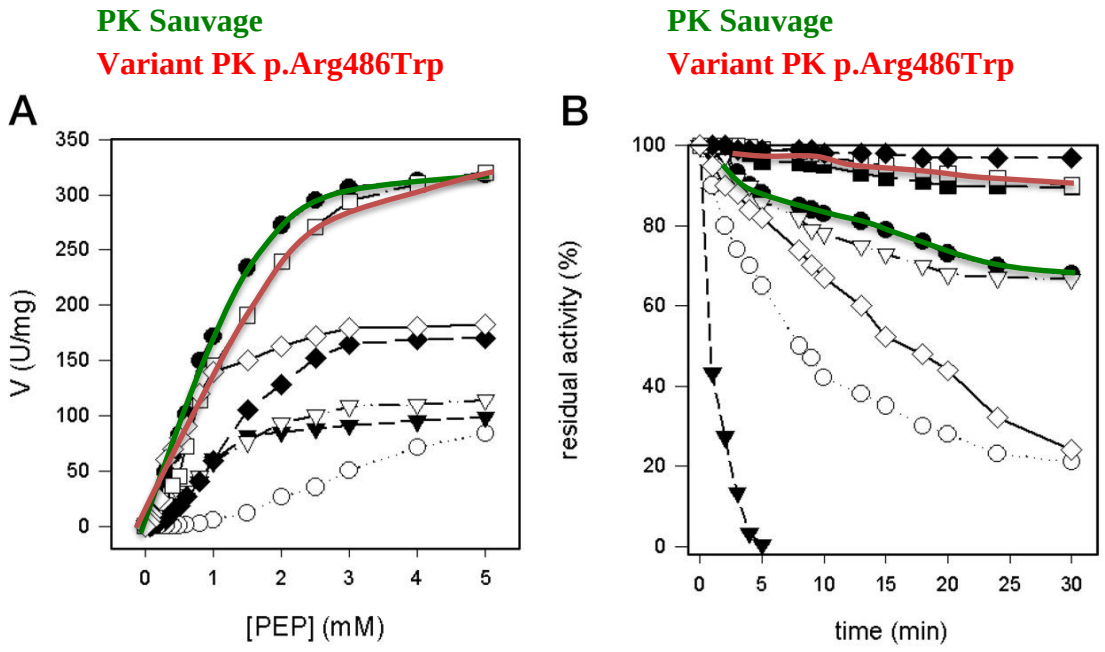


Figure 42 –P*ropriétés fonctionnelles de p.Arg486Trp in vitro*
(Source : Valentini et al., *The Journal of biological chemistry*, 2002 (27))

En revanche, l'altération de l'activité enzymatique est due à l'abaissement de la capacité de catalyse du mutant, égale à moins de 30% de celle de la forme sauvage, avec une augmentation du K_m du PEP.

A noter que cette mutation est très peu retrouvée à l'état homozygote (à peine plus de 4 cas rapportés dans le Monde) (79). Sa prévalence est augmentée au Sud de l'Europe (58) (voir *Figure 34*).

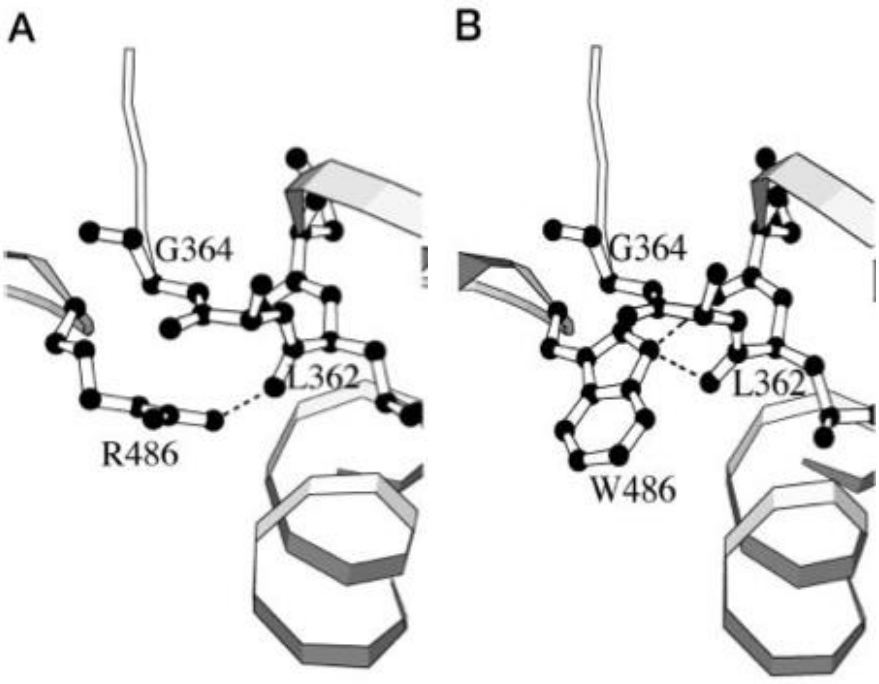


Figure 43 – *Représentation tridimensionnelle de l'impact de la mutation p.Arg486Trp*
A gauche, forme sauvage; A droite, forme mutée p.Arg486Trp
(Source : Valentini et al., *The Journal of biological chemistry*, 2002 (27))

4.2.3. Autres mutations récurrentes

4.2.3.1. p.Asn393Ser

Située à l'interface A/A, cette mutation est retrouvée 7 fois à l'état hétérozygote composite dans notre série, et est associée à des phénotypes de sévérité variable, sévère en association avec p.Arg510Gln, modéré avec p.Arg486Trp.

4.2.3.2. p.Arg479His

Retrouvée 4 fois à l'état hétérozygote composite et associée à des phénotypes sévères dans la littérature (3/4 ont des phénotypes sévères dans notre série), cette mutation implique la perte d'une arginine proche du site de liaison du 1,6-FDP, mais non-impliquée directement.

En contraste avec la sévérité des manifestations cliniques, la cinétique n'est pas affectée. Cependant, elle impacte un site d'épissage, et il a été démontré une transcription effondrée, ce qui pourrait expliquer le tableau clinique et biologique.

4.2.3.3. p.Glu241stop

Ce mutant a un site actif tronqué, et il est associé à deux phénotypes sévères dans notre série.

4.3. Prise en charge des patients déficitaires en PK

Aucun consensus organisant la prise en charge des patients déficitaires en PK n'est disponible en raison de l'extrême variabilité de la présentation du déficit en PK, mais aussi du bénéfice apporté par chaque option thérapeutique.

4.3.1. Prise en charge classique

De nombreux patients sont paucisymptomatiques. A ce titre, l'abstention thérapeutique associée à un suivi régulier de la numération globulaire couplée à un bilan martial, peuvent être proposés, à l'image de ce qui est proposé dans les thalassémies intermédiaires.

Chez les patients dont le taux d'hémoglobine est très effondré ou en cas de mauvaise tolérance de l'anémie, des transfusions occasionnelles ou un véritable régime transfusionnel peuvent être mis en place. L'indication et le rythme des séances transfusionnelles doivent être posés sur des arguments cliniques plutôt que sur le taux d'hémoglobine. En effet, l'accumulation de 2,3BPG entraine une diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, et donc une augmentation paradoxale de la tolérance de l'anémie (4). Ce mécanisme peut expliquer, au moins partiellement, la bonne tolérance d'anémies profondes (exemple de bd05, taux d'hémoglobine=5,8g/dL, non-transfusé, non-splénectomisé).

Une splénectomie peut être proposée, encadrée par les mesures habituelles de prophylaxie, mais il est difficile de prédire le bénéfice apporté. Les indications sont une mauvaise tolérance de l'anémie avec des besoins transfusionnels importants. Le gain moyen d'hémoglobine rapporté dans la série italienne de Zanella et al. est de 3g/dL (97), ce qui est concordant avec les résultats disponibles pour 3 patients dans notre série. La splénectomie n'a pas d'impact sur la persistance de l'hémolyse, mais elle réduit le plus souvent, voire anihile les besoins transfusionnels.

4.3.2. Allogreffe de moelle osseuse

Plusieurs équipes ont fait état du bénéfice apporté par une allogreffe de cellules souches hématoïétiques dans des modèles animaux avec déficit en PK (125–127).

La littérature fait état du premier et unique cas (porté à notre connaissance) d'allogreffe de moelle osseuse (sœur ABO et HLA-identique) menée en Thaïlande (128) en novembre 1996 chez un enfant de 5 ans. Ce patient était né à terme avec une pâleur cutanée, un ictère néonatal, et une hémoglobine à 9,6 g/dL.

A l'âge de 4 mois, le taux d'hémoglobine était effondré à 5,5 g/dL avec une mauvaise tolérance nécessitant de nombreuses transfusions. Une hépatosplénomégalie a été notée dès l'âge de 13 mois. Après objectivation du déficit, le régime transfusionnel a été poursuivi, associé à une chélation du fer jusqu'à l'âge de 3 ans. L'hémoglobine moyenne était de 13g/dL, mais en contrepartie, la ferritinémie sous chélation atteignait 950 ng/ml.

Dans ce contexte, l'indication d'une allogreffe de moelle osseuse a été posée. La greffe a eu lieu après hypertransfusion pour réduire l'excès d'érythropoïèse compensatrice et l'hématopoïèse extramédullaire.

Après la greffe, il n'a été transfusé qu'à trois reprises (dernière transfusion 10 jours post-greffe). L'activité de la PK a été ensuite contrôlée à 110% (20% avant greffe) par rapport à un témoin sain. Les suites à plus long terme (8 ans de recul dans la publication) montrent une très bonne évolution sur les plans clinique et biologique.

En France, l'indication d'allogreffe a été récemment posée (mai 2013) chez un patient déficitaire suivi à Strasbourg (non-inclus dans notre série) avec une présentation similaire.

4.3.3. Thérapie génique

Trois modèles animaux de thérapie génique ont été présentés dans la littérature, utilisant une transduction de l'ADNc de PK-R (dérivé de *PKLR* sauvage) dans des cellules souches déficientes à l'aide de vecteurs gammaretroviraux.

Kanno et al. (129), ont construit un gène hybride promoteur de la β-globine humaine (μLCR, pour *locus control région*)/PK-L humaine et PK-R humaine sauvages, contenant toutes les séquences codantes et le promoteur proximal (voir *Figure 44*), visant à augmenter l'expression de PK-R dans les cellules érythroïdes. Cet hybride était injecté dans les noyaux de cellules-œuf de souris déficitaires en PK.

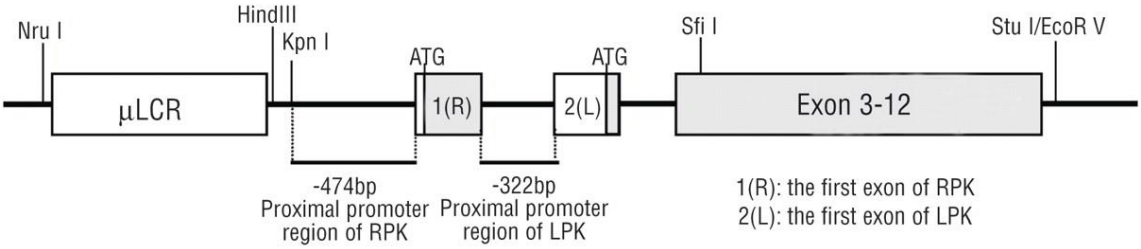


Figure 44 – *Gène hybride construit par Kanno et al.*
(Source : Kanno et al., *Haematologica*, 2007 (130))

Après correction par le transgène contenant la PK-R sauvage couplé au promoteur de la β-globine, l'activité PK des souris était trois fois plus élevée que les souris non-traitées. En parallèle, l'hémolyse était diminuée (taux d'hémoglobine et de réticulocytes augmentés). Les concentrations des métabolites intermédiaires de la glycolyse étaient normalisées.

Tani et al. (131), puis Meza et al. (130,132) ont exposé des modèles murins de correction d'un déficit en PK par des vecteurs rétroviraux, chez des souris dont le phénotype érythrocytaire était proche de celui noté chez l'homme. Dans les travaux de Meza et al., deux vecteurs rétroviraux étaient transduits, SF11XEG contenant EGFP, et SF11XEG contenant la PK-R humaine et la EGFP dans un unique transcrit d'ARNm. Les cellules ont été transplantées :

- Chez des souris adultes irradiées, avec résolution secondaire des altérations érythrocytaires liées au déficit, restauration d'un taux d'hémoglobine et de réticulocytes normal et normalisation du profil biochimique (notamment correction des niveaux d'ATP)
- Sur fœtus in utero, non-conditionnés, avec prise de greffe très faible et obtention d'une correction partielle du déficit.

Dans ce modèle, le métabolisme des cellules non-érythrocytaires n'était pas affecté par l'excès d'expression de PK-R (transduction non-sélective) et aucun signe de leucémogenèse ou de dysplasie secondaire n'a été mis en évidence. La qualité de la correction sur le long terme était très dépendant du chimérisme initial.

En 2012, Trobridge et al. (133) ont utilisé un vecteur viral (spumavirus) exprimant la PK (FV-SMPcPKW) et le promoteur de l'ankyrine pour assurer une expression spécifique dans les cellules érythroïdes. Ce vecteur était transduit à une lignée de cellules souches, transplantées à des chiens déficitaires en PK myélo-ablatés. Une correction du déficit en PK a été objectivée.

4.4. Limites et perspectives

4.4.1. Limites

Cette étude comporte à la fois toutes les limites d'un travail rétrospectif, et celle d'une cohorte dont les données doivent être actualisées régulièrement.

Il faut donc considérer que les données exposées ici ne sont qu'une photographie instantanée contenant des informations certainement obsolètes pour certains patients car perdus de vue depuis quelques années. De la même façon, le caractère rétrospectif de l'étude nous a exposé à des biais principalement d'information.

En outre, toutes les données requises sur la fiche d'inclusion n'étaient pas disponibles pour chaque patient, et dans certains cas nous avons dû nous contenter du génotype et de quelques informations, que nous n'avons parfois pas intégrées à la base de données, en raison de leur caractère approximatif.

Cette non-exhaustivité dans les données collectées, nous a poussé à rester strictement descriptifs sans utiliser d'outils statistiques plus poussés. En effet, la plupart du temps, les sous-groupes étaient composés de faibles effectifs, ne permettant que des conclusions fragiles. Il apparaît donc fondamental d'agrandir l'effectif, en étendant l'inclusion à l'ensemble des centres français, pour tendre vers l'exhaustivité.

Ces limites pourront être en partie levées dans la suite de la conduite de l'étude CODE PK en vue de bâtir un véritable registre entretenu par un investigateur dédié.

4.4.2. Perspectives

L'INSERM définit un registre comme le *recueil continu et exhaustif de données nominatives intéressant un ou plusieurs événements de santé dans une population géographiquement définie* (134).

Les registres permettent une quantification fine et une caractérisation des cas prévalents et incidents d'une pathologie. Les registres de morbidité constituent donc à la fois un outil irremplaçable pour la surveillance sanitaire et des bases de données d'une très grande qualité pour la recherche.

Les registres sont structurés autour d'une instance unique : le comité national des registres (pilotage conjoint des ministères de la santé et de la recherche), créé par arrêté ministériel du 6 novembre 1995 modifié (135). Les objectifs de ce comité sont :

- L'évaluation de la qualité des registres de morbidité, l'émission d'avis sur l'opportunité des registres existants ou en création.
- La proposition d'une politique des registres s'appuyant sur les besoins en matière de santé publique et de recherche épidémiologique
- La mise en œuvre chaque année et selon un mode structuré et standardisé, d'une procédure d'évaluation scientifique de la qualité et de la valorisation des données, pour les registres qui lui soumettent une demande de qualification.

L'avis favorable du comité à la qualification d'un registre est considéré comme un label de qualité garantissant sa pertinence en santé publique et sa qualité scientifique. La première qualification est valable 3 ans, elle est ensuite renouvelable tous les 4 ans. 42 registres sont actuellement qualifiés.

Depuis 2007, un Comité national des registres spécialisé dans les maladies rares a été créé (CNM-MR). 6 registres de maladies rares sont qualifiés.

Les critères d'évaluation retenus visent à apprécier :

- L'exhaustivité de l'enregistrement des cas : production d'indicateurs fiables d'incidence
- La pertinence des informations recueillies, les méthodes et procédures
- L'intérêt et la pertinence du registre en terme de surveillance et de recherche
- L'activité de recherche s'appuyant sur les données du registre

En pratique, alors que l'avis du CCTIRS et l'autorisation de la CNIL sont obligatoires à la mise en œuvre d'un registre, l'avis favorable du Comité des registres n'est pas un prérequis. Néanmoins, seuls les registres qualifiés sont susceptibles d'obtenir un financement public national.

En novembre 2013, l'InVS, INSERM, et l'INCa ont mis en place un Comité d'évaluation des registres (CER), dont les missions sont identiques à celles du Comité national des registres (supprimé par décret le 23 mai 2013) (136).

En pratique, les objectifs du registre des déficitaires en PK sont multiples :

- Le principal serait d'obtenir des données épidémiologiques nationales sur la pathologie

- Les objectifs secondaires seraient :
    - L'élaboration de recommandations de prise en charge des patients déficitaires en PK
    - Une corrélation phénotype-génotype afin d'identifier des paramètres prédictifs de l'évolution de la pathologie
    - Le suivi dans le temps de l'évolution des nouvelles thérapeutiques, en particulier l'utilisation croissante des chélateurs actifs par voie orale et la diffusion des nouvelles techniques d'évaluation de la surcharge tissulaire par l'IRM hépatique et cardiaque.
    - La comparaison deses résultats du traitement conventionnel associant transfusions et chélation du fer à ceux de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques.
- Finalement, ce registre pourrait nourrir des projets de recherche plus fondamentaux

Etant donné les faibles effectifs, il paraît intéressant de réfléchir d'emblée à la création d'un registre européen des déficitaires en PK, potentiellement sous l'égide du réseau ENERCA (European Network for Rare and Congenital Anaemias).

CONCLUSION

Le déficit en PK est une altération de la voie d'Embden-Meyerhof intraérythrocytaire, ubitaire et rare. Les manifestations cliniques surviennent uniquement chez les patients homozygotes ou hétérozygotes composites pour des mutations de *PKLR*, situé sur le chromosome 1 et codant pour les isoenzymes PK-R et PK-L.

Comme exposée dans nos résultats, la présentation clinique et biologique varie énormément d'un individu à l'autre et au sein d'une même famille. Chez le nourrisson, le déficit peut être létal dans les premiers mois de vie. A l'âge adulte, il constitue un facteur de risque d'hémochromatose, secondaire à l'hémolyse chronique et à la dérégulation de l'aborption digestive du fer régulée par l'hepcidine.

Les stratégies thérapeutiques sont choisies en fonction du taux d'hémoglobine et de la tolérance de l'anémie, notamment les transfusions et la splénectomie. En cas de bonne tolérance, notamment chez l'adulte, l'abstention thérapeutique associée à un suivi de la ferritinémie, du CST et à des mesures IRM hépatiques et cardiaques, peut être proposée.

En outre, une prise en charge spécifique de la surcharge martiale doit être proposée avec une ferritinémie cible entre 500 et 1000ng/mL. L'allogreffe de moelle osseuse reste d'indication exceptionnelle et des modèles animaux de thérapie génique ont été publiés.

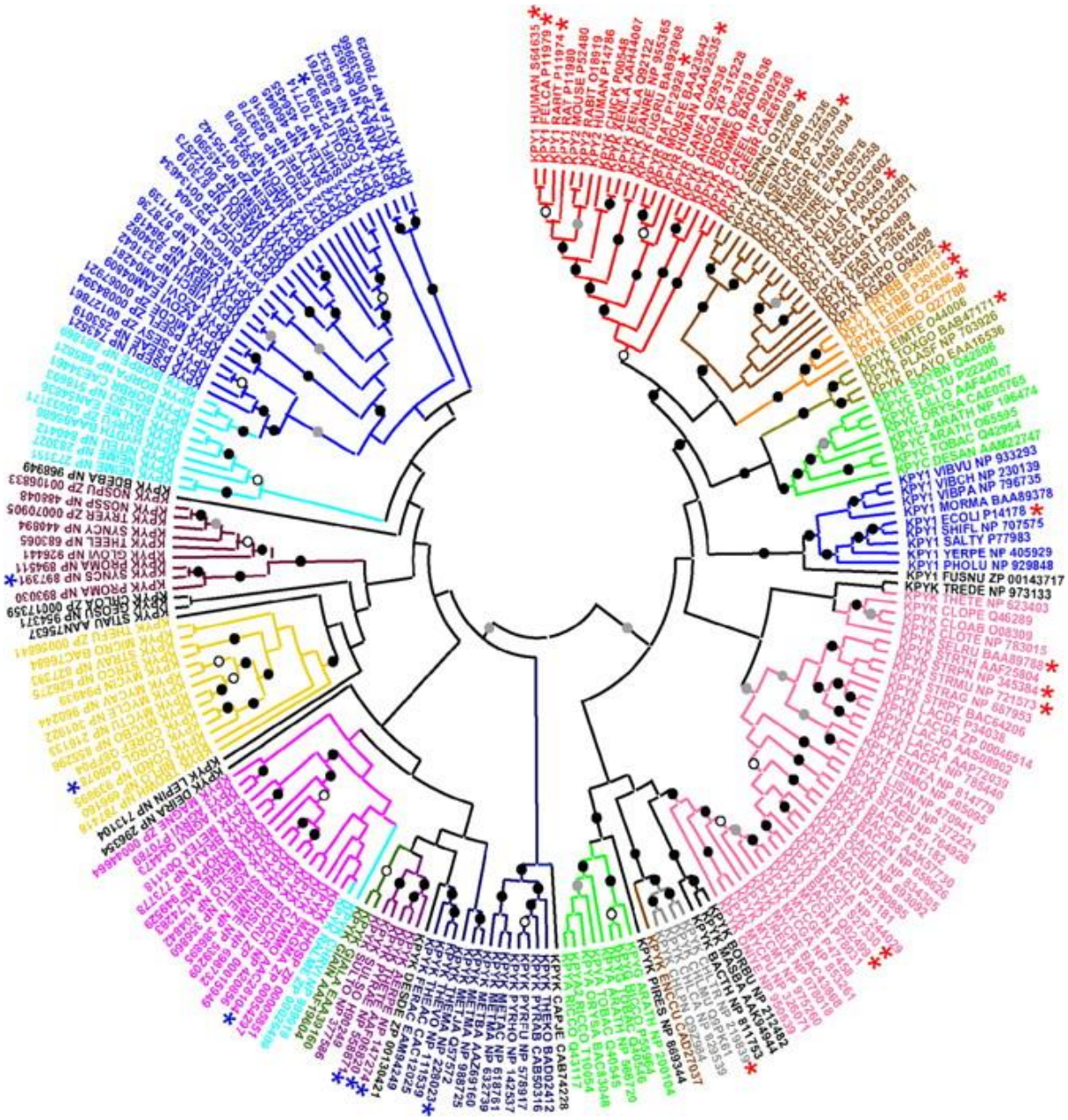
Dans la série CODE PK, comme dans la littérature européenne, deux mutations sont de forte prévalence. p.Arg510Gln, mutant dont la thermostabilité est altérée, est associé à des phénotypes plutôt sévères. p.Arg486Trp possède un déficit catalytique qui induit des formes plus modérées. En outre, nous rapportons de nouveaux mutants.

Ce travail est l'amorce d'une étude plus exhaustive, permettant par la suite la constitution d'un registre national ou européen avec un système standardisé de suivi des patients, qui contribuera à accroître les connaissances sur la pathologie et devrait permettre des progrès dans la prise en charge des patients.

ANNEXES

Annexe 1 – Phylogénèse de la pyruvate kinase

Les couleurs permettent un regroupement par taxon.
(source : Oria-Hernández J et al. J. Biol. Chem. 2006 (18))



KPY1 HUMAN S64635 splice form M1 – human — *Homo sapiens* pyruvate kinase (EC 2.7.1.40), muscle

KPY1 FELCA P11979 kinase muscle isozyme) — *Felis catus* pyruvate kinase isozyme M1 (Pyruvate

KPY1 RABIT P11974 M1/M2 (Pyruvate kinase muscle isozyme) — *Oryctolagus cuniculus* pyruvate kinase isozymes

KPY1 RAT P11980 (Pyruvate kinase muscle isozyme) — *Rattus norvegicus* pyruvate kinase isozymes M1/M2

KPY2 MOUSE P52480 — *Mus musculus* pyruvate kinase isozyme M2

KPY2 RABIT O18919 — *Oryctolagus cuniculus* pyruvate kinase M2 isozyme

KPY2 HUMAN P14786 — *Homo sapiens* pyruvate kinase, M2 isozyme

KPYK CHICK P00548 — *Gallus gallus* pyruvate kinase muscle isozyme

KPYK XENLA AAH44007 — *Xenopus laevis* Pkm2-prov protein

KPYK XENLA Q92122 (Cytosolic thyroid hormone-binding protein) (CTHBP) — *Xenopus laevis* pyruvate kinase muscle isozyme

KPYK DANRE NP_955365 — *Danio rerio* pyruvate kinase, muscle

KPYK FUGRU BAB92968 — *Takifugu rubripes* pyruvate kinase

KPYR RAT P12928 — Rattus norvegicus pyruvate kinase isozymes R/L (L-PK)

KPYR MOUSE BAA23642 — *Mus musculus* pyruvate kinase

KPYR HUMAN AAA92535 — *Homo sapiens* pyruvate kinase PK-R isoenzyme

KPYR CANFA Q29536 — *Canis familiaris* pyruvate kinase isozyme R

KPYK ANOGA XP_315228 — *Anopheles gambiae* pyruvate kinase

KPYK DROME O62619 — *Drosophila melanogaster* pyruvate kinase

KPYK BOMMO BAD01636 — *Bombyx mori* pyruvate kinase

KPYK CAEEL NP 502029 — *Caenorhabditis elegans* pyruvate kinase

KPYK CAEBR CAE61956 — *Caenorhabditis briggsae* hypothetical pyruvate kinase

KPYK ASPNG Q12669 — *Aspergillus niger* pyruvate kinase

KPYK EMENI P22360 — *Emericella nidulans* pyruvate kinase

KPYK ASPOR BAB12236 — *Aspergillus oryzae* pyruvate kinase

KPYK NEUCR XP 325930 — *Neurospora crassa* pyruvate kinase

KPYK MAGGR EAA57094 — *Magnaporthe grisea* hypothetical pyruvate kinase

KPYK TRIRE P31865 — *Hypocrea jecorina* pyruvate kinase

KPYK TRIRE EAA76876 — Gibberella zeae pyruvate kinase

KPYK SACKL AAO32558 — *Saccharomyces kluyveri* pyruvate kinase

KPYK KLULA AAO32602 — Kluyveromyces lactis pyruvate kinase

KPY1 YEAST P00549 — *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate kinase 1

KPY1 SACCA AAO32480 — *Saccharomyces castellii* pyruvate kinase

KPY1 SACBA AAO32371 — *Saccharomyces bayanus* pyruvate kinase

KPY2 YEAST P52489 — *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate kinase 2

KPYK YARLI P30614 — *Yarrowia lipolytica* pyruvate kinase

KPYK SCHPO Q10208 — *Schizosaccharomyces pombe* pyruvate kinase

KPYK AGABI O94122 — *Agaricus bisporus* pyruvate kinase

KPY1 TRYBB P30615 — *Trypanosoma brucei brucei* pyruvate kinase 1

KPY2 TRYBB P30616 — *Trypanosoma brucei brucei* pyruvate kinase 2

KPYK LEIME Q27686 — *Leishmania mexicana* pyruvate kinase

KPYK TRYBO Q27788 — *Trypanoplasma borreli* pyruvate kinase

KPYK EIMTE O44006 — *Eimeria tenella* pyruvate kinase

KPYK TOXGO BAB47171 — *Toxoplasma gondii* pyruvate kinase

KPYK PLASF NP 703926 — *Plasmodium falciparum* pyruvate kinase

KPYK PLAYO EAA16536 — *Plasmodium yoelii yoelii* pyruvate kinase

KPYC SOYBN Q42806 — *Glycine max* pyruvate kinase, cytosolic isozyme

KPYC SOLTU P22200 — Solanum tuberosum pyruvate kinase, cytosolic isozyme

KPYC LILLO AAF44707 — *Lilium longiflorum* cytosolic pyruvate kinase

KPYC ORYSA CAE05765 — Oryza sativa pyruvate kinase

KPYC2 ARATH NP_196474 — *Arabidopsis thaliana* pyruvate kinase

KPYC ARATH O65595 cytosolic isozyme — Arabidopsis thaliana probable pyruvate kinase,

KPYC TOBAC Q42954 — *Nicotiana tabacum* pyruvate kinase, cytosolic isozyme

KPYC DESAN AAM22747 — *Deschampsia antarctica* pyruvate kinase-like

KPY1 VIBVU NP_933293 — *Vibrio vulnificus* pyruvate kinase

KPY1 VIBCH NP_230139 — *Vibrio cholerae* pyruvate kinase

KPY1 VIBPA NP_796735 — *Vibrio parahaemolyticus* pyruvate kinase

KPY1 MORMA BAA89378 — *Moritella marina* pyruvate kinase

KPY1 ECOLI P14178 — Escherichia coli pyruvate kinase I

KPY1 SHIFL NP_707575 — Shigella flexneri pyruvate kinase

KPY1 SALTY P77983 — *Salmonella typhimurium* pyruvate kinase I

KPY1 YERPE NP_405929 — *Yersinia pestis* pyruvate kinase

KPY1 PHOLU NP_929848 kinase — *Photorhabdus luminescens subsp. Laumondii* pyruvate

KPY1 FUSNU ZP_00143717 kinase — *Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii* pyruvate

KPYK TREDE NP_973133 — *Treponema denticola* pyruvate kinase

KPYK THETE NP_623403 — *Thermoanaerobacter tengcongensis* pyruvate kinase

KPYK CLOPE Q46289 — *Clostridium perfringens* pyruvate kinase

KPYK CLOAB O08309 — Clostridium acetobutylicum pyruvate kinase

KPYK CLOTE NP_783015 — *Clostridium tetani* pyruvate kinase

KPYK SELRU BAA89788 — *Selenomonas ruminantium* pyruvate kinase

KPYK STRTH AAF25804 — *Streptococcus thermophilus* pyruvate kinase

KPYK STRPN NP_345384 — *Streptococcus pneumoniae* pyruvate kinase

KPYK STRMU NP_721573 — *Streptococcus mutans* pyruvate kinase

KPYK STRAG NP_687953 — *Streptococcus agalactiae* pyruvate kinase

KPYK STRPY BAC64206 — *Streptococcus pyogenes* putative pyruvate kinase

KPYK LACDE P34038 kinase — *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* pyruvate

KPYK LACGA ZP_00046514 — *Lactobacillus gasseri* pyruvate kinase

KPYK LACJO AAS08902 — *Lactobacillus johnsonii* pyruvate kinase

KPYK LACCA AAP72039 — *Lactobacillus casei* pyruvate kinase

KPYK LACPL NP_785440 — *Lactobacillus plantarum* pyruvate kinase

KPYK ENTFA NP_814779 — *Enterococcus faecalis* pyruvate kinase

KPYK LISMO NP_465095 — *Listeria monocytogenes* pyruvate kinase

KPYK LISIN NP_470941 — *Listeria innocua* pyruvate kinase

KPYK STAAU NP_372221 — *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* pyruvate kinase

KPYK STAEP NP_764928 — *Staphylococcus epidermidis* pyruvate kinase

KPYK BACPY P51182 — *Sporosarcina psychrophila* pyruvate kinase

KPYK BACSP AAK57730 — *Bacillus sphaericus* putative pyruvate kinase

KPYK BACAN NP_658626 — *Bacillus anthracis* pyruvate kinase

KPYK BACCE NP_834305 — *Bacillus cereus* pyruvate kinase

KPYK OCEIH NP_693092 — *Oceanobacillus iheyensis* pyruvate kinase

KPYK BACSU P80885 — Bacillus subtilis pyruvate kinase (Vegetative protein 17)

KPYK BACLI P51181 — Bacillus licheniformis pyruvate kinase

KPYK BACHA NP_244029 — *Bacillus halodurans* pyruvate kinase

KPYK BACST S27330 isoform 1 — *Geobacillus stearothermophilus* pyruvate kinase

KPYK BACST Q02499 — *Geobacillus stearothermophilus* pyruvate kinase

KPYK MYCGE P47458 — *Mycoplasma genitalium* pyruvate kinase

KPYK MYCGA NP_853261 — *Mycoplasma gallisepticum* pyruvate kinase

KPYK MYCPE BAC43868 — *Mycoplasma penetrans* pyruvate kinase

KPYK UREUR NP_078018 — *Ureaplasma parvum* pyruvate kinase

KPYK MYCMY NP_975260 — *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* pyruvate kinase

KPYK MYCPU NP_326071 — *Mycoplasma pulmonis* pyruvate kinase

KPYK ONIYE NP_950539 — Onion yellows phytoplasma pyruvate kinase

KPYK BORBU NP_212482 — *Borrelia burgdorferi* pyruvate kinase

KPYK MASBA AAK94944 — *Mastigamoeba balamuthi* pyruvate kinase

KPYK BACTH NP_811753 — *Bacteroides thetaiotaomicron* pyruvate kinase

KPYK CHLTR NP_219839 — *Chlamydia trachomatis* pyruvate kinase

KPYK CHLMU Q9PK61 — *Chlamydia muridarum* pyruvate kinase

KPYK CHLCA NP_829539 — *Chlamydophila caviae* pyruvate kinase

KPYK CHLPN Q9Z984 — *Chlamydophila pneumoniae* pyruvate kinase

KPYK ENCCU CAD27037 — *Encephalitozoon cuniculi* pyruvate kinase

KPYK PIRES NP_869344 — *Rhodopirellula baltica* pyruvate kinase

KPYG ARATH NP_200104 — *Arabidopsis thaliana* pyruvate kinase

KPYG RICCO P55964 chloroplast — *Ricinus communis* pyruvate kinase, isozyme G,

KPYG TOBAC Q40546 chloroplast precursor — *Nicotiana tabacum* pyruvate kinase, isozyme G,

KPYA ARATH NP_566720 — *Arabidopsis thaliana* pyruvate kinase

KPYA TOBAC Q40545 chloroplast precursor — *Nicotiana tabacum* pyruvate kinase, isozyme A,

KPYA ORYSA BAC83048 chloroplast precursor — *Oryza sativa* putative pyruvate kinase, isozyme A,

KPYA2 RICCO T10054 — *Ricinus communis* pyruvate kinase, isoform beta

KPYA RICCO Q43117 chloroplast precursor — *Ricinus communis* pyruvate kinase, isozyme A,

KPYK CAPJE CAB74228 — *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* pyruvate kinase

KPYK THEKO BAD02412 — *Thermococcus kodakaraensis* pyruvate kinase

KPYK PYRAB CAB50316 — *Pyrococcus abyssi* pyruvate kinase pyk

KPYK PYRFU NP_578917 — *Pyrococcus furiosus* pyruvate kinase

KPYK PYRHO NP_142537 — *Pyrococcus horikoshii* pyruvate kinase

KPYK METAC NP_618761 — *Methanosarcina acetivorans* pyruvate kinase

KPYK METMA NP_632739 — *Methanosarcina mazei* pyruvate kinase

KPYK METBA AAZ69160 — *Methanosarcina barkeri* pyruvate kinase

KPYK METMA NP_988725 — *Methanococcus maripaludis* pyruvate kinase

KPYK METJA Q57572 — *Methanocaldococcus jannaschii* pyruvate kinase

KPYK THEMA NP_228023 — *Thermotoga maritima* pyruvate kinase

KPYK THEVO NP_111539 — *Thermoplasma volcanium* pyruvate kinase

KPYK THEAC CAC12025 — *Thermoplasma acidophilum* pyruvate kinase

KPYK FERAC EAM94249 — *Ferroplasma acidarmanus* pyruvate kinase

KPYK DESDE ZP_00130421 — *Desulfovibrio desulfuricans* pyruvate kinase

KPYK AERPE NP_147274 — *Aeropyrum pernix* pyruvate kinase

KPYK THETE AAF06820 — *Thermoproteus tenax* pyruvate kinase

KPYK PYRAE NP_558871 — *Pyrobaculum aerophilum* pyruvate kinase

KPYK SULSO H90249 — *Sulfolobus solfataricus* pyruvate kinase

KPYK SULTO NP_377586 — *Sulfolobus tokodaii* pyruvate kinase

KPYK GIALA EAA39160 — *Giardia lamblia* pyruvate kinase

KPYK GIAIN AAF19604 — *Giardia intestinalis* pyruvate kinase

KPYK CHRVI NP_899919 — *Chromobacterium violaceum* pyruvate kinase

KPYK RALME ZP_00026409 — *Ralstonia metallidurans* pyruvate kinase

KPYK RHOSP ZP_00005851 — *Rhodobacter sphaeroides* pyruvate kinase

KPYK MAGMA ZP_00054297 — *Magnetospirillum magnetotacticum* pyruvate kinase

KPYK ZYMMO AAC28104 — *Zymomonas mobilis* pyruvate kinase

KPYK CAUCR NP_420856 — *Caulobacter crescentus* pyruvate kinase

KPYK RHORU ZP_00015949 — *Rhodospirillum rubrum* pyruvate kinase

KPYK BRUSU NP_698732 — *Brucella suis* pyruvate kinase

KPYK BRUME NP_539209 — *Brucella melitensis* pyruvate kinase

KPYK SINME NP_386895 — *Sinorhizobium meliloti* pyruvate kinase

KPYK AGRTU NP_356860 — *Agrobacterium tumefaciens* pyruvate kinase

KPYK MESLO NP_104842 — *Mesorhizobium loti* pyruvate kinase

KPYK BARHE AAL74283 — *Bartonella henselae* pyruvate kinase

KPYK RHOPA NP_949529 — *Rhodopseudomonas palustris* pyruvate kinase

KPYK BRAJA NP_773778 — *Bradyrhizobium japonicum* pyruvate kinase

KPYK METEX O05118 — *Methylobacterium extorquens* pyruvate kinase

KPY4 AGRVI Q44473 — *Agrobacterium vitis* pyruvate kinase

KPY3 AGRVI P70789 — *Agrobacterium vitis* pyruvate kinase

KPYK MAGNE ZP_00044664 — *Magnetococcus sp*

KPYK DEIRA NP_296354 — *Deinococcus radiodurans* pyruvate kinase

KPYK LEPIN NP_713104 — *Leptospira interrogans* pyruvate kinase

KPYK TROWH NP_787418 — *Tropheryma whipplei* pyruvate kinase

KPYK BIFLO NP_696160 — *Bifidobacterium longum* pyruvate kinase

KPYK CORDI NP_939895 — *Corynebacterium diphtheriae* pyruvate kinase

KPYK CORGL Q46078 — *Corynebacterium glutamicum* pyruvate kinase

KPYK COREF Q8FP04 — *Corynebacterium efficiens* pyruvate kinase

KPYK MYCBO NP_855296 — *Mycobacterium bovis* pyruvate kinase

KPYK MYCTU NP_216133 — *Mycobacterium tuberculosis* pyruvate kinase

KPYK MYCLE NP_301922 — *Mycobacterium leprae* pyruvate kinase

KPYK MYCAV NP_960244 kinase — *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* pyruvate

KPYK MYCIN P94939 — *Mycobacterium intracellulare* pyruvate kinase

KPYK STRCO NP_626275 — *Streptomyces coelicolor* pyruvate kinase

KPYK STRAV NP_827393 — *Streptomyces avermitilis* pyruvate kinase

KPYK MICRO BAC76684 — *Microbispora rosea subsp. aerata* pyruvate kinase

KPYK THEFU ZP_00056841 — *Thermobifida fusca* pyruvate kinase

KPYK STIAU AAN75637 protein 2 — *Stigmatella aurantiaca* pyruvate kinase, indole-binding

KPYK GEOSU NP_954371 — *Geobacter sulfurreducens* pyruvate kinase

KPYK CHLOA ZP_00017359 — *Chloroflexus aurantiacus* pyruvate kinase

KPYK PROMA NP_893030 — *Prochlorococcus marinus subsp. pastoris*

KPYK SYNCS NP_897391 — *Synechococcus sp* pyruvate kinase

KPYK PROMA NP_894511 — *Prochlorococcus marinus* pyruvate kinase

KPYK GLOVI NP_926441 — *Gloeobacter violaceus* pyruvate kinase

KPYK THEEL NP_683065 — *Thermosynechococcus elongates* pyruvate kinase

KPYK SYNCY NP_440894 — *Synechocystis sp* pyruvate kinase

KPYK TRYER ZP_00070905 — *Trichodesmium erythraeum* pyruvate kinase

KPYK NOSSP NP_488048 — *Nostoc sp* pyruvate kinase

KPYK NOSPU ZP_00106833 — *Nostoc punctiforme* pyruvate kinase

KPYK BDEBA NP_968949 — *Bdellovibrio bacteriovorus* pyruvate kinase

KPYK NEIME NP_273151 — *Neisseria meningitides* pyruvate kinase

KPYK NEIME NP_283027 — *Neisseria meningitides* pyruvate kinase

KPYK NITEU NP_840412 — *Nitrosomonas europaea* pyruvate kinase

KPYK HYDTH BAA95686 — *Hydrogenophilus thermoluteolus* pyruvate kinase

KPYK BURFU ZP_00033171 — *Burkholderia fungorum* pyruvate kinase

KPYK RALME EAN54836 — *Ralstonia metallidurans* pyruvate kinase

KPYK RALSO NP_518693 — *Ralstonia solanacearum* pyruvate kinase

KPYK BORBR CAE34461 — *Bordetella bronchiseptica* pyruvate kinase

KPYK BORPA NP_885821 — *Bordetella parapertussis* pyruvate kinase

KPYK BORPE NP_881869 — *Bordetella pertussis* pyruvate kinase

KPYK PSEPU NP_743521 — *Pseudomonas putida* pyruvate kinase

KPYK PSEAE NP_253019 — *Pseudomonas aeruginosa* pyruvate kinase

KPYK PSESY ZP_00127861 — *Pseudomonas syringae pv. Syringae* pyruvate kinase

KPYK PSEFL ZP_00084394 — *Pseudomonas fluorescens* pyruvate kinase

KPYK MICDE ZP_00067921 — *Microbulbifer degradans* pyruvate kinase

KPYK AZOVI EAM04809 — *Azotobacter vinelandii* pyruvate kinase

KPYK AZOVI EAM04281 — *Azotobacter vinelandii* pyruvate kinase

KPYK VIBCH NP_231642 — *Vibrio cholerae* pyruvate kinase

KPYK VIBVU NP_934082 — *Vibrio vulnificus* pyruvate kinase

KPYK VIBPA NP_798418 — *Vibrio parahaemolyticus* pyruvate kinase

KPYK CANBL NP_878736 — *Candidatus Blochmannia floridanus* pyruvate kinase

KPYK WIGGL NP_871139 kinase — *Wigglesworthia glossinidia* hypothetical pyruvate

KPYK BUCAI P57404 — *Buchnera aphidicola* pyruvate kinase

KPYK ACTPL ZP_00134634 — *Actinobacillus pleuropneumoniae* pyruvate kinase

KPYK HAEDU NP_873019 — *Haemophilus ducreyi* pyruvate kinase

KPYK HAESO ZP_00122573 — *Haemophilus somnus* pyruvate kinase

KPYK PASMU NP_245590 — *Pasteurella multocida subsp. multocida* pyruvate kinase

KPYK HAEIN ZP_00155142 — *Haemophilus influenzae* pyruvate kinase

KPYK HAEIN P43924 — *Haemophilus influenzae* pyruvate kinase

KPY2 SHEON NP_718078 — *Shewanella oneidensis* pyruvate kinase

KPY2 PHOLU NP_929378 kinase — *Photorhabdus luminescens subsp. Laumondii* pyruvate

KPY2 YERPE NP_405616 — *Yersinia pestis* pyruvate kinase

KPY2 SALTY NP_460845 — *Salmonella typhimurium* pyruvate kinase

KPY2 SALEN NP_456455 — *Salmonella enterica subsp. enterica* pyruvate kinase

KPY2 SHIFL NP_707714 — *Shigella flexneri* pyruvate kinase

KPY2 ECOLI P21599 — *Escherichia coli* pyruvate kinase II

KPYK COXBU NP_820761 — *Coxiella burnetii* pyruvate kinase

KPYK XANCA NP_638532 — *Xanthomonas campestris* pyruvate kinase

KPYK XANAX NP_643652 — *Xanthomonas axonopodis* pyruvate kinase

KPYK XILFA ZP_00039966 — *Xylella fastidiosa* pyruvate kinase

KPYK XYLFA NP_780029 — *Xylella fastidiosa* pyruvate kinase

Annexe 2 – Mutations de *PKLR* déjà décrites

D'après *The Human Gene Mutation Database*, Biobase, 2013

Mutations faux-sens

Mutation ADN	Changement d'acide aminé	Position	Référence
GCG-GGG	Ala-Gly	36	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
GGG-GAG	Gly-Glu	37	Beutler (1997) Hum Mutat 9, 282
gCGG-TGG	Arg-Trp	40	van Wijk (2009) Hum Mutat 30, 446
CTC-CCC	Leu-Pro	73	van Wijk (2009) Hum Mutat 30, 446
cTCC-CCC	Ser-Pro	80	Uenaka (1995) Biochem Biophys Res Commun 208, 991
CGC-CCC	Arg-Pro	86	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
ATC-AAC	Ile-Asn	90	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
ACC-ATC	Thr-Ile	93	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
cGGG-AGG	Gly-Arg	95	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
ATG-ACG	Met-Thr	107	Baronciani (1995) Blood Cells Mol Dis 21, 49
cGGG-AGG	Gly-Arg	111	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
tGCG-CCG	Ala-Pro	115	Rouger (1996) Br J Haematol 92, 825
TCC-TTC	Ser-Phe	120	Rouger (1996) Br J Haematol 92, 825
CACg-CAA	His-Gln	121	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
TCC-TAC	Ser-Tyr	130	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
GTC-GAC	Val-Asp	134	Baronciani (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4324
cCGG-TGG	Arg-Trp	135	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
gGCG-ACG	Ala-Thr	137	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
aGGT-AGT	Gly-Ser	143	Kedar (2009) Clin Genet 75, 157
ATC-ACC	Ile-Thr	153	Kugler (2000) Hum Mutat 15, 261
cGCC-ACC	Ala-Thr	154	van Wijk (2009) Hum Mutat 30, 446
CTG-CCG	Leu-Pro	155	Baronciani (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4324
GGA-GTA	Gly-Val	159	Demina (1998) Blood 92, 647
cCGC-TGC	Arg-Cys	163	Neubauer (1991) Blood 77, 1871
CGC-CTC	Arg-Leu	163	van Wijk (2009) Hum Mutat 30, 446
GGG-GTG	Gly-Val	165	van Wijk (2009) Hum Mutat 30, 446
cCTG-ATG	Leu-Met	167	Kedar (2009) Clin Genet 75, 157
aGAG-CAG	Glu-Gln	172	Zanella (1997) Blood 89, 3847
gGAA-TAA	Glu-Term	174	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
gTGG-CGG	Trp-Arg	201	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
TGGg-TGA	Trp-Term	201	Baronciani (1995) Blood Cells Mol Dis 21, 49
ATT-ACT	Ile-Thr	219	Kugler (2000) Hum Mutat 15, 261
cGAC-AAC	Asp-Asn	221	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
GGG-GCG	Gly-Ala	222	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273

ATC-ACC	Ile-Thr	224	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
cGGC-TGC	Gly-Cys	232	Titapiwatanakun (2008) Pediatr Blood Cancer 51, 819
gGAG-TAG	Glu-Term	241	Baronciani (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4324
gAAC-GAC	Asn-Asp	253	Zanella (2005) Br J Haematol 130, 11
cGGG-AGG	Gly-Arg	263	Lenzner (1997) Blood 89, 1793
cGGG-TGG	Gly-Trp	263	Zanella (1997) Blood 89, 3847
cGAG-AAG	Glu-Lys	266	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
cCGA-TGA	Arg-Term	270	Baronciani (1995) J Clin Invest 95, 1702
cCTG-GTG	Leu-Val	272	Zanella (2005) Br J Haematol 130, 11
CTG-CCG	Leu-Pro	272	Manco (2009) Hum Genet 125 343
cGGG-AGG	Gly-Arg	275	Zanella (1997) Blood 89, 3847
cGGG-CGG	Gly-Arg	275	Baronciani (1995) Blood Cells Mol Dis 21, 49
gGAC-AAC	Asp-Asn	281	Miwa (1996) Am J Hematol 51, 122
cTTT-CTT	Phe-Leu	287	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
cTTT-GTT	Phe-Val	287	Beutler (1996) Hum Mutat 7, 1
tGTG-TTG	Val-Leu	288	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
cGAC-AAC	Asp-Asn	293	Kugler (2000) Hum Mutat 15, 261
GCT-GTT	Ala-Val	295	Demina (1998) Blood 92, 647
ATC-AAC	Ile-Asn	310	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
ATT-ACT	Ile-Thr	314	Kanno (1994) Blood 84, 3505
tGAG-AAG	Glu-Lys	315	Demina (1998) Blood 92, 647
AACc-AAG	Asn-Lys	316	Costa (2005) Haematologica 90, 25
cGTG-ATG	Val-Met	320	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
cGTG-CTG	Val-Leu	320	Raphael (2007) Am J Hematol 82, 1025
AGCg-AGA	Ser-Arg	330	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
cGAC-AAC	Asp-Asn	331	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
GAC-GGC	Asp-Gly	331	Gupta (2006) Prenat Diagn 27, 117
GACg-GAA	Asp-Glu	331	Baronciani (1995) J Clin Invest 95, 1702
cGGC-AGC	Gly-Ser	332	Lenzner (1994) Blood 83, 2817
gGTG-ATG	Val-Met	335	Zanella (2001) Br J Haematol 113, 43
gGCA-TCA	Ala-Ser	336	Lenzner (1994) Blood 83, 2817
aCGG-TGG	Arg-Trp	337	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
CGG-CAG	Arg-Gln	337	Lenzner (1997) Blood 89, 1793
CGG-CCG	Arg-Pro	337	Pastore (1998) Hum Mutat 11, 127
gGAC-CAC	Asp-His	339	Zarza (1998) Br J Haematol 103, 377
GGC-GAC	Gly-Asp	341	Demina (1998) Blood 92, 647
GGC-GCC	Gly-Ala	341	Baronciani (1995) J Clin Invest 95, 1702
cATC-TTC	Ile-Phe	342	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
AAGg-AAT	Lys-Asn	348	Kanno (1997) Blood 89, 4213
GCT-GAT	Ala-Asp	352	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
ATT-ACT	Ile-Thr	357	Zarza (1998) Br J Haematol 103, 377
GGG-GAG	Gly-Glu	358	Zanella (2005) Br J Haematol 130, 11
tGGG-AGG	Gly-Arg	358	Kedar (2009) Clin Genet 75, 157

CGC-CAC	Arg-His	359	Baronciani (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4324
gCGC-TGC	Arg-Cys	359	Miwa (1996) Am J Hematol 51, 122
TGC-TAC	Cys-Tyr	360	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
cAAC-GAC	Asn-Asp	361	Lenzner (1994) Blood 83, 2817
GGC-GAC	Gly-Asp	364	van Solinge (1997) Blood 90, 4987
AAG-ATG	Lys-Met	365	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
tGTC-TTC	Val-Phe	368	Kanno (1993) Biochem Biophys Res Commun 192, 46
ACA-ATA	Thr-Ile	371	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
CTG-CCG	Leu-Pro	374	Zanella (2005) Br J Haematol 130, 11
AGC-ATC	Ser-Ile	376	Lenzner (1997) Blood 89, 1793
ACG-ATG	Thr-Met	384	Kanno (1991) Proc Natl Acad Sci U S A 88, 8218
AGG-AAG	Arg-Lys	385	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
gAGG-TGG	Arg-Trp	385	Beutler (2000) Blood 95, 3585
GAG-GGG	Glu-Gly	387	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
cGAT-AAT	Asp-Asn	390	Zanella (1997) Blood 89, 3847
cGCC-ACC	Ala-Thr	392	Lenzner (1994) Blood 83, 2817
AAT-AGT	Asn-Ser	393	Baronciani (1995) J Clin Invest 95, 1702
AATg-AAA	Asn-Lys	393	Baronciani (1995) J Clin Invest 95, 1702
cAAT-GAT	Asn-Asp	393	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
GCT-GAT	Ala-Asp	394	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
GCT-GTT	Ala-Val	394	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
tGCT-TCT	Ala-Ser	394	Kedar (2009) Clin Genet 75, 157
GAT-GTT	Asp-Val	397	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
GGG-GCG	Gly-Ala	398	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
ATGc-ATA	Met-Ile	403	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
aGGG-AGG	Gly-Arg	406	Kedar (2009) Clin Genet 75, 157
GAG-GGG	Glu-Gly	407	Kedar (2009) Clin Genet 75, 157
gGAG-AAG	Glu-Lys	407	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
ACT-ATT	Thr-Ile	408	Zarza (1998) Br J Haematol 103, 377
gACT-GCT	Thr-Ala	408	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
cAAG-GAG	Lys-Glu	410	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
GGC-GCC	Gly-Ala	411	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
gGGC-AGC	Gly-Ser	411	Park-Hah (2005) Acta Haematol 113, 208
gCAG-AAG	Gln-Lys	421	Kanno (1992) Blood 79, 1347
cCGG-TGG	Arg-Trp	426	Baronciani (1995) Blood Cells Mol Dis 21, 49
CGG-CAG	Arg-Gln	426	Kanno (1993) Blood 81, 2439
GAG-GCG	Glu-Ala	427	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
GAGg-GAT	Glu-Asp	427	Lenzner (1997) Blood 89, 1793
cGCA-ACA	Ala-Thr	431	Zarza (1998) Br J Haematol 103, 377
gGAG-TAG	Glu-Term	440	Sedano (2004) Br J Haematol 127, 364
cATT-GTT	Ile-Val	457	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
GGT-GAT	Gly-Asp	458	Baronciani (1995) J Clin Invest 95, 1702
GCT-GTT	Ala-Val	459	Baronciani (1995) Blood Cells Mol Dis 21, 49

GTG-GCG	Val-Ala	460	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
tGTG-ATG	Val-Met	460	Baronciani (1995) J Clin Invest 95, 1702
GCT-GGT	Ala-Gly	468	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
GCT-GTT	Ala-Val	468	Kanno (1994) Blood 84, 3505
GCC-GAC	Ala-Asp	470	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
aACT-GCT	Thr-Ala	477	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
cCGC-TGC	Arg-Cys	479	Manco (2009) Hum Genet 125 340
CGC-CAC	Arg-His	479	Kanno (1994) Blood 83, 2311
TCT-TTT	Ser-Phe	485	Lenzner (1997) Blood 89, 1793
CGG-CTG	Arg-Leu	486	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
tCGG-TGG	Arg-Trp	486	Baronciani (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4324
cCGA-TGA	Arg-Term	488	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
CGA-CAA	Arg-Gln	488	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
tCGG-TGG	Arg-Trp	490	Uenaka (1995) Biochem Biophys Res Commun 208, 991
GCT-GTT	Ala-Val	495	Baronciani (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4324
tGCT-ACT	Ala-Thr	495	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
cCGC-TGC	Arg-Cys	498	Pastore (1998) Hum Mutat 11, 127
CGC-CAC	Arg-His	498	Lenzner (1994) Blood 83, 2817
cCAG-TAG	Gln-Term	501	Baronciani (1995) Blood Cells Mol Dis 21, 49
GCC-GTC	Ala-Val	503	Zarza (1999) Med Clin (Barc) 112, 606
CGC-CTC	Arg-Leu	504	Demina (1998) Blood 92, 647
gGTC-ATC	Val-Ile	506	Zarza (2000) Haematologica 85, 227
TTA-TGA	Leu-Term	508	Beutler (1996) Hum Mutat 7, 1
cCGA-TGA	Arg-Term	510	Demina (1998) Blood 92, 647
CGA-CAA	Arg-Gln	510	Baronciani (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4324
aGGA-AGA	Gly-Arg	511	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
cCGT-AGT	Arg-Ser	518	Zanella (1997) Blood 89, 3847
tCGC-TGC	Arg-Cys	531	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
cCGG-TGG	Arg-Trp	532	Lenzner (1994) Blood 83, 2817
CGG-CAG	Arg-Gln	532	Zarza (1998) Br J Haematol 103, 377
GAAa-GAT	Glu-Asp	538	Manco (2009) Hum Genet 125 340
GAC-GTC	Asp-Val	550	Kugler (2000) Hum Mutat 15, 261
gGTG-ATG	Val-Met	552	Baronciani (1995) Blood Cells Mol Dis 21, 49
GGC-GCC	Gly-Ala	557	Manco (1999) Br J Haematol 105, 591
gCGA-GGA	Arg-Gly	559	Baronciani (1995) Blood Cells Mol Dis 21, 49
gCGA-TGA	Arg-Term	559	Zarza (1998) Br J Haematol 103, 377
AACa-AAA	Asn-Lys	566	Miwa (1996) Am J Hematol 51, 122
cATG-GTG	Met-Val	568	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
CGG-CAG	Arg-Gln	569	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
CGG-CTG	Arg-Leu	569	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683

Mutations de sites d'épissage (introns)

Mutation	Référence
IVS1 ds +10 G-A	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
IVS1 as -1 G-A	Lenzner (1994) Blood 83, 2817
IVS3 as -2 A-C	Zanella (1997) Blood 89, 3847
IVS3 as -2 A-T	Kanno (1997) Blood 89, 4213
IVS3 as -1 G-A	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
IVS4 ds +2 T-C	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
IVS4 ds +10 G-T	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
IVS4 as -1 G-A	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
IVS5 ds -1 G-A	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
IVS5 ds +1 G-A	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
IVS5 ds +20 C-A	Kedar (2009) Clin Genet 75, 157
IVS6 ds -1 G-T	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
IVS6 as -2 A-T	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
IVS7 ds +1 G-T	Kanno (1993) Blood 82S1 97A
IVS8 ds +2 T-G	Manco (1999) Br J Haematol 105, 591
IVS9 ds -1 G-A	Kanno (1997) Blood 89, 4213
IVS9 ds -1 G-C	Zanella (1997) Blood 89, 3847
IVS9 ds +3 A-G	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
IVS9 ds +5 G-A	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
IVS9 ds +43 T-C	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
IVS9 ds +44 C-T	Kedar (2009) Clin Genet 75, 157
IVS9 ds +93 A-C	Kedar (2009) Clin Genet 75, 157
IVS9 as -1 G-C	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
IVS10 ds +1 G-C	Manco (1999) Br J Haematol 105, 591
IVS11 ds -1 G-C	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
IVS11 ds +1 G-C	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
IVS11 as -3 C-G	Zanella (2005) Br J Haematol 130, 11

Courtes délétions

Délétion (^=numéro du codon)	**Changement d'acide aminé**
GGCCCAA$^{\wedge 47}$CTGacccaggagctgggcactGCCTTCTTCC	van Wijk (2009) Hum Mutat 30, 446
CTCTGC$^{\wedge 75}$CTACtggacATTGACTCCG	Zanella (1997) Blood 89, 3847
GACTCC$^{\wedge 81}$GAGCcCGTGGCTGCT	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
CTCCGTG$^{\wedge 102}$GAGcGCCTCAAGGA	Baronciani (1995) J Clin Invest 95, 1702
TGCTGAG$^{\wedge 130}$TCCatcGCCAACGTCC	Baronciani (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4324
TGCAGGT$^{\wedge 144}$TCCcCACTCAGCTA	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
TATTGTC$^{\wedge 209}$CGGgtCGTGCCGGTG	Lenzner (1997) Blood 89, 1793
CCGGTG$^{\wedge 214}$GGGGgCCGCATCTAC	Kedar (2009) Clin Genet 75, 157

TGCGC^274TTCGGgGTGGAGCATG	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
GAGAAC^317CACGaaggCGTGAAGAGG	Pissard (2006) Br J Haematol 133, 683
GTGGCA^337CGGGgGGACCTAGGC	Zanella (2001) Br J Haematol 113, 43
CCCAGCA^347GAGaagGTTTTCCTGG	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273
CCTGGCT^353CAGaagATGATGATTG	Lenzner (1994) Blood 83, 2817
GTGCTG^397GATGgGGCTGACTGC	Rouger (1996) Br J Haematol 92, 825
AGAGGCC^431GCAgtgtaccaCCGGCAGCTG	Titapiwatanakun (2008) Pediatr Blood Cancer 51, 819
TCATT^495GCTGTcACCCGCTCTG	Rouger (1996) Br J Haematol 92, 825
ATTGAA^539AGTG_E11I11_gTGAGCTACCT	Zanella (2005) Br J Haematol 130, 11

Courtes insertions

Insertion (^=numéro du codon)	**Nucléotide**	**Référence**
CAG^61CTGccagcagcagcagctgCCAGCTGCTA	183	Kugler (2000) Hum Mutat 15, 261
CTACATT^220GACgacGACGGGCTCA	664	Kanno (1994) Blood 84S1 13a
AACTTG^363GCGGgGCAAGCCTGT	1091	Baronciani (1995) J Clin Invest 95, 1702
AGAGC^377ATGATgagagcatgatTACCAAGCCC	1133	Diez (2005) Blood 106, 1851
GGCTGAC^401TGCagcATCATGCTGT	1204	Lenzner (1994) Blood 83, 2817
CCGCCAG^506GTCggtcCACTTATGCC	1519	Zanella (2001) Br J Haematol 113, 43
AGCCATC^525TGGgGCAGATGATG	1574	Baronciani (1995) Blood Cells Mol Dis 21, 49
CTTCCTC^547CGTaGTTGGAGACC	1641	Baronciani (1998) Blood Cells Mol Dis 24, 273

Délétions larges

Délétion	**Changement d'acide aminé**
1149 bp, ex. 11	Baronciani (1995) J Clin Invest 95, 1702
22 bp c.109-130	Manco (2008) Hum Genet 124 319
5 kb incl. ex. 4-10, ivs 3-nt. 1431	Fermo (2005) Br J Haematol 129, 839
c.1618+37_2064del1477	van Wijk (2009) Hum Mutat 30, 446
ex. 4-10	Costa (2005) Haematologica 90, 25

Mutations du promoteur

Séquence	**Position**	**Référence**
CCTACTGGGTGTGCCCCTTTTCTCTTCTCT(G-C)TCTCCCTTAGATAAGACCAGCAGTTTTGTC	-83	van Wijk (2003) Blood 101, 1596

GTGCCCCTTTTCTCTTCTCTGTCTCCCTTA(G-C)ATAAGACCAGCAGTTTTGTCATCCTCTCCC	-73	Marcello (2008) Blood Cells Mol Dis 41, 261
TGCCCCTTTTCTCTTCTCTGTCTCCCTTAG(A-G)TAAGACCAGCAGTTTTGTCATCCTCTCCCT	-72	Manco (1999) Hum Genet 105 188

Annexe 3 – Fiche d'inclusion dans sa version la plus récente (mars 2013)

Société d'Hématologie et d'Immunologie Pédiatrique
Fédération des Centres de Référence et de Compétence des Maladies Constitutionnelles du Globule Rouge

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE BORDEAUX
ASSISTANCE PUBLIQUE – HOPITAUX DE MARSEILLE
ASSISTANCE PUBLIQUE – HOPITAUX DE PARIS

Dr Stéphanie DULUCQ – Dr Marguerite MICHEAU – Dr Serge PISSARD – Dr Isabelle THURET – M. Olivier LACRAMPE

ETUDE CODE-PK

PATIENTS ATTEINTS DE DEFICIT EN PYRUVATE KINASE INTRAERYTHROCYTAIRE HOMOZYGOTES OU HETEROZYGOTES COMPOSITES

FICHE D'INCLUSION

Document à adresser au Dr Marguerite MICHEAU / M. Olivier LACRAMPE

- **Par courriel après numérisation au format PDF : code.pk@chu-bordeaux.fr**
- **Par courrier** : Laboratoire d'Hématologie, Plateau Technique à Réponse Rapide, Hôpital Pellegrin, Place Amélie Raba-Léon, 33000 BORDEAUX.

NE RIEN ECRIRE DANS CE CADRE	
CENTRE n°	IDENTIFICATION PATIENT :

Date des dernières données disponibles pour ce patient : / /

Médecin en charge du patient : Dr .....
Hôpital : ..... Service : .....
Adresse : .....
Tél. : ..... Fax : .....
E-mail : .....

IDENTITE DU PATIENT ET HISTOIRE FAMILIALE		
3 premières lettres du **NOM**	3 premières lettres du **PRENOM**	
Sexe : H F	Date de naissance : / /	Né dans département n°
Pays de naissance du patient :		
Origine géographique du **père** :	Origine géographique de la **mère** :	
Nombre total de frères et sœurs :	Nombre de grossesses menées à terme :	
Antécédent familial de diagnostic de déficit en PK : NON, OUI → précisez le lien de parenté :		
Antécédent familial d'anémie chronique : NON, OUI → précisez le lien de parenté :		
Antécédent familial d'ictère : NON, OUI → Néonatal, Chronique → lien de parenté :		

Les items suivants se rapportent aux CIRCONSTANCES DU DIAGNOSTIC
Âge au diagnostic : anténatal / J0 → J30 / 1 mois → 2 ans / après 2 ans / après 50 ans Précisez la date du diagnostic si possible (=évocation d'un déficit en PK) : / /
Anémie : NON, OUI → Signes cliniques : asthénie, pâleur, dyspnée.
Ictère : NON, OUI → ictère néonatal : NON, OUI
Autre événement clinique ayant mené au diagnostic :
Autre maladie du globule rouge : NON, OUI → précisez :

Les items suivants se rapportent à la BIOLOGIE AU DIAGNOSTIC
Taux d'Hb : g/dL, taux de réticulocytes : G/L, VGM : fl, le / /
Bilirubine totale : µmol/L, Bilirubine conjuguée : µmol/L, le / /
Activité de la pyruvate kinase : NON, OUI → (préciser l'unité), le / / Normes du laboratoire pour l'activité pyruvate kinase :
Activité de la G6PD : NON, OUI → (préciser l'unité), le / / Normes du laboratoire pour l'activité G6PD :
Activité enzymatique de l'hexokinase : NON, OUI → (préciser l'unité), le / / Normes du laboratoire pour l'activité hexokinase :
Génotype du gène PKLR : → **Exprimez les mutations en nomenclature « p. AA1>AA2 » (en utilisant des codes à 3 lettres)** Date du génotypage : / /

COMPLICATIONS CHRONIQUES
Lithiase vésiculaire : NON, OUI → Date : / / Cholécystectomie NON, OUI → Date : / /
Erythroblastopénie à PVB19 : NON, OUI →date : / / , objectivée : NON, OUI
Retard staturopondéral < - 2DS : NON, OUI → date de la cassure : / /
Retard pubertaire (13 ans pour la fille, 14 ans pour le garçon) : NON, OUI
Splénomégalie : NON, OUI → débord au-dessus, au-dessous de l'ombilic, date de découverte le : / /
Signe d'hémochromatose : Diabète / Hypothyroidie / Hypogonadisme / Hypoparathyroïdie / Fibrose hépatique / Insuffisance cardiaque / Autre :
Erythropoïèse ectopique : NON, OUI → Complication thromboembolique : NON, OUI → nature : date : / / HTAP : NON, OUI → critère diagnostique : date : / / Ostéoporose (Z-score ≤ -2DS) : NON, OUI, préciser date d'ostéodensitométrie : / / Autre complication chronique NON, OUI → nature : date : / /

PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DEPUIS LE DIAGNOSTIC

Le patient a bénéficié d'une splénectomie : NON, OUI → date : / /
- Hémoglobine avant splénectomie : g/dL → date : / /
- Hémoglobine après splénectomie : g/dL → date : / /

Transfusion de culots globulaires : NON, OUI → date de la première transfusion le : / /

- si OUI, exsanguinotransfusion : NON, OUI → le : / /

- si OUI, nombre total de séances : entre 1 et 10 / entre 11 et 20 / plus de 20 / plus de 100

- si OUI, état du régime transfusionnel : en cours / interrompu le : / /

Traitement au long cours par acide folique : NON, OUI → débuté le : / /

Chélateur du fer : NON, OUI → Chélateur actuel : ,débuté le : / /
Si traitement chélateur → Ferritinémie AVANT début du traitement : g/L Hb, le / /

Corticothérapie : NON, OUI → nature : ,débutée le : / /

Traitement par EPO : NON, OUI → débuté le : / /

Saignées : NON, OUI → débutées le : / /

Allogreffe de moelle osseuse : NON, OUI → date : / /

STATUT BIOLOGIQUE ACTUEL DU CAS INDEX

Taux d'Hb : g/dL, taux de réticulocytes : G/L, le : / /

Bilirubine totale : µmol/L, conjuguée : µmol/L, le : / /

Ferritinémie : µg/L, le / /

LDH plasmatique : UI/L, le / /

Haptoglobine plasmatique : g/L, le / /

STATUT BIOLOGIQUE DE LA MERE

Taux d'Hb : g/dl, taux de réticulocytes : G/L, le : / /

Présence d'un syndrome anémique : NON, OUI, d'un ictère NON, OUI ,

Présence d'un autre symptôme NON, OUI → nature :

Bilirubine totale : µmol/L, conjuguée : µmol/L, le : / /

Activité de la pyruvate kinase : NON, OUI → (préciser l'unité) , le / /
Normes du laboratoire pour l'activité pyruvate kinase :

Activité de la G6PD : NON, OUI → (préciser l'unité) , le / /
Normes du laboratoire pour l'activité G6PD :

Activité enzymatique de l'hexokinase : NON, OUI → (préciser l'unité), le / /
Normes du laboratoire pour l'activité hexokinase :

Génotype du gène PKLR :
→ **Exprimez les mutations en nomenclature « p. AA1>AA2 » (en utilisant des codes à 3 lettres)**

Date du génotypage : / /

STATUT BIOLOGIQUE DU PERE

Taux d'Hb : g/dl, taux de réticulocytes : G/L, le : / /

Présence d'un syndrome anémique : NON, OUI, d'un ictère NON, OUI ,

Présence d'un autre symptôme NON, OUI → nature :

Bilirubine totale : µmol/L, conjuguée : µmol/L, le : / /

Activité de la pyruvate kinase : NON, OUI → (préciser l'unité) , le / /
Normes du laboratoire pour l'activité pyruvate kinase :

Activité de la G6PD : NON, OUI → (préciser l'unité) , le / /
Normes du laboratoire pour l'activité G6PD :

Activité enzymatique de l'hexokinase : NON, OUI → (préciser l'unité), le / /
Normes du laboratoire pour l'activité hexokinase :

Génotype du gène PKLR :
→ **Exprimez les mutations en nomenclature « p. AA1>AA2 » (en utilisant des codes à 3 lettres)**

Date du génotypage : / /

EVALUATION DE LA SURCHARGE MARTIALE PAR IRM

- Le patient a bénéficié d'IRM **hépatique** : NON, OUI →
  - 1ère IRM : µmol/g de foie sec → date : / /
  - Dernière IRM réalisée : µmol /g de foie sec → date : / /

- Le patient a bénéficié d'IRM **cardiaque** : NON, OUI → date : / /
  - Fer cardiaque < 20ms de T2*
  - Fer cardiaque > 20ms de T2*

BIBLIOGRAPHIE

1. Van Wijk R, van Solinge WW. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. Blood. 2005 Dec 15;106(13):4034–42.

2. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (. Biochemistry Edition 5th. New York: W H Freeman; 2007.

3. Delivoria-Papadopoulos M, Oski FA, Gottlieb AJ. Oxygen-hemoglobulin dissociation curves: effect of inherited enzyme defects of the red cell. Science. 1969 Aug 8;165(3893):601–2.

4. Huehns ER. The physiological consequences of changes in oxygen affinity in the red cell enzyme defects. J Clin Pathol. 1974;142–4.

5. Stammers DK, Muirhead H. Three-dimensional structure of cat muscle pyruvate kinase at 6 Angstrom resolution. J Mol Biol. 1975 Jun 25;95(2):213–25.

6. Kayne FJ, Price NC. Amino acid effector binding to rabbit muscle pyruvate kinase. Arch Biochem Biophys. 1973 Nov;159(1):292–6.

7. Schramm A, Siebers B, Tjaden B, et al. Pyruvate kinase of the hyperthermophilic crenarchaeote Thermoproteus tenax: physiological role and phylogenetic aspects. J Bacteriol. 2000 Apr;182(7):2001–9.

8. Fothergill-Gillmore LA, Rigden DJ, Michels PA, et al. Leishmania pyruvate kinase: the crystal structure reveals the structural basis of its unique regulatory properties. Biochem Soc Trans. 2000 Feb;28(2):186–90.

9. Allen SC, Muirhead H. Refined three-dimensional structure of cat-muscle (M1) pyruvate kinase at a resolution of 2.6 A. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 1996 May 1;52(Pt 3):499–504.

10. Larsen TM, Laughlin LT, Holden HM, et al. Structure of rabbit muscle pyruvate kinase complexed with Mn2+, K+, and pyruvate. Biochemistry (Mosc). 1994 May 24;33(20):6301–9.

11. Mattevi A, Valentini G, Rizzi M, et al. A. Crystal structure of Escherichia coli pyruvate kinase type I: molecular basis of the allosteric transition. Struct Lond Engl 1993. 1995 Jul 15;3(7):729–41.

12. Rigden DJ, Phillips SE, Michels PA, et al.. The structure of pyruvate kinase from Leishmania mexicana reveals details of the allosteric transition and unusual effector specificity. J Mol Biol. 1999 Aug 20;291(3):615–35.

13. Knowles VL, Dennis DT, Plaxton WC. Purification of a novel pyruvate kinase from a green alga. FEBS Lett. 1989 Dec 18;259(1):130–2.

14. Pawluk A, Scopes RK, Griffiths-Smith K. Isolation and properties of the glycolytic enzymes from Zymomonas mobilis. The five enzymes from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase through to pyruvate kinase. Biochem J. 1986 Aug 15;238(1):275–81.

15. Nairn J, Smith S, Allison PJ, et al. Cloning and sequencing of a gene encoding pyruvate kinase from Schizosaccharomyces pombe; implications for quaternary structure and regulation of the enzyme. FEMS Microbiol Lett. 1995 Dec 15;134(2-3):221–6.

16. Plaxton WC, Smith CR, Knowles VL. Molecular and regulatory properties of leucoplast pyruvate kinase from Brassica napus (rapeseed) suspension cells. Arch Biochem Biophys. 2002 Apr 1;400(1):54–62.

17. Lin M, Turpin DH, Plaxton WC. Pyruvate kinase isozymes from the green alga, Selenastrum minutum. I. Purification and physical and immunological characterization. Arch Biochem Biophys. 1989 Feb 15;269(1):219–27.

18. Oria-Hernández J, Riveros-Rosas H, Ramírez-Sílva L. Dichotomic Phylogenetic Tree of the Pyruvate Kinase Family K+-DEPENDENT AND -INDEPENDENT ENZYMES. J Biol Chem. 2006 Oct 13;281(41):30717–24.

19. Saavedra-Lira E, Ramirez-Silva L, Perez-Montfort R. Expression and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from Entamoeba histolytica. Biochim Biophys Acta. 1998 Jan 15;1382(1):47–54.

20. Allert S, Ernest I, Poliszczak A, Opperdoes FR, et al. Molecular cloning and analysis of two tandemly linked genes for pyruvate kinase of Trypanosoma brucei. Eur J Biochem FEBS. 1991 Aug 15;200(1):19–27.

21. Oria-Hernández J, Cabrera N, Pérez-Montfort R, Ramírez-Silva L. Pyruvate Kinase Revisited THE ACTIVATING EFFECT OF K+. J Biol Chem. 2005 Nov 11;280(45):37924–9.

22. Noguchi T, Yamada K, Inoue H, et al. T. The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. J Biol Chem. 1987 Oct 15;262(29):14366–71.

23. Takegawa S, Fujii H, Miwa S. Change of pyruvate kinase isozymes from M2- to L-type during development of the red cell. Br J Haematol. 1983 Jul;54(3):467–74.

24. Max-Audit I, Testa U, Kechemir D, et al. Pattern of pyruvate kinase isozymes in erythroleukemia cell lines and in normal human erythroblasts. Blood. 1984 Oct;64(4):930–6.

25. Max-Audit I, Kechemir D, Mitjavila MT, et al. Pyruvate kinase synthesis and degradation by normal and pathologic cells during erythroid maturation. Blood. 1988 Sep;72(3):1039–44.

26. Kahn A, Marie J. Pyruvate kinases from human erythrocytes and liver. Methods Enzymol. 1982;90 Pt E:131–40.

27. Valentini G, Chiarelli LR, Fortin R, et al. Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase. Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia. J Biol Chem. 2002 Jun 28;277(26):23807–14.

28. Campanella ME, Chu H, Low PS. Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 15;102(7):2402–7.

29. Wang C, Chiarelli LR, Bianchi P, et al. Human erythrocyte pyruvate kinase: characterization of the recombinant enzyme and a mutant form (R510Q) causing nonspherocytic hemolytic anemia. Blood. 2001 Nov 15;98(10):3113–20.

30. Valentini G, Chiarelli L, Fortin R, et al. The Allosteric Regulation of Pyruvate Kinase A SITE-DIRECTED MUTAGENESIS STUDY. J Biol Chem. 2000 Jun 16;275(24):18145–52.

31. Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, et al. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. Struct Lond Engl 1993. 1998 Feb 15;6(2):195–210.

32. Wooll JO, Friesen RH, White MA, et al. Structural and functional linkages between subunit interfaces in mammalian pyruvate kinase. J Mol Biol. 2001 Sep 21;312(3):525–40.

33. Jacobasch G. Biochemical and genetic basis of red cell enzyme deficiencies. Baillières Best Pr Res Clin Haematol. 2000 Mar;13(1):1–20.

34. Mattevi A, Bolognesi M, Valentini G. The allosteric regulation of pyruvate kinase. FEBS Lett. 1996 Jun 24;389(1):15–9.

35. Mesecar AD, Nowak T. Metal-ion-mediated allosteric triggering of yeast pyruvate kinase. 2. A multidimensional thermodynamic linked-function analysis. Biochemistry (Mosc). 1997 Jun 3;36(22):6803–13.

36. Monod J, Wyman J, Changeux J-P. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. J Mol Biol. 1965 May;12(1):88–118.

37. Carey PJ, Chandler J, Hendrick A, et al. Prevalence of pyruvate kinase deficiency in a northern European population in the north of England. Blood. 2000 Dec 1;96(12):4005–6.

38. Blume KG, Lingen AV, Löhr GW, et al. Beitrag zur Populationsgenetik der Glutathionreduktase menschlicher Erythrocyten. Hum Genet. 1968 Sep 1;6(3):266–9.

39. Mohrenweiser HW. Functional hemizygosity in the human genome: direct estimate from twelve erythrocyte enzyme loci. Hum Genet. 1987 Nov;77(3):241–5.

40. Beutler E, Gelbart T. Estimating the prevalence of pyruvate kinase deficiency from the gene frequency in the general white population. Blood. 2000 Jun 1;95(11):3585–8.

41. Bowman HS, Mc Kusick VA, Dronamraju KR. Pyruvate Kinase Deficient Hemolytic Anemia in an Amish Isolate. Am J Hum Genet. 1965 Jan;17(1):1–8.

42. Yavarian M, Shahian M, Karimi M, et al. Prevalence of Pyruvate Kinase Deficiency among the Newborns (Shiraz-Iran). Iran J Blood Cancer. 2009 Mar 15;1(3):89–93.

43. M. Leporrier. Anémies hémolytiques héréditaires (hémoglobinopathies exclues). 2013.

44. Pierre Boivin. Structures, métabolismes et physiologie des globules rouges humains. EMC - Hématologie. 1994.

45. Boivin P. Role of the phosphorylation of red blood cell membrane proteins. Biochem J. 1988 Dec 15;256(3):689–95.

46. Kuypers FA, Scott MD, Schott MA, et al. Use of ektacytometry to determine red cell susceptibility to oxidative stress. J Lab Clin Med. 1990 Oct;116(4):535–45.

47. Takakuwa Y, Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane material properties by Ca2+ and calmodulin. Implications for their role in regulation of skeletal protein interactions. J Clin Invest. 1988 Aug;82(2):394–400.

48. Boivin P. [Molecular interactions of membrane proteins and erythrocyte deformability]. Acta Médica Port. 1983 Apr;Suppl:13–36.

49. Aizawa S, Kohdera U, Hiramoto M, et al. Ineffective erythropoiesis in the spleen of a patient with pyruvate kinase deficiency. Am J Hematol. 2003 Sep;74(1):68–72.

50. Aizawa S, Harada T, Kanbe E, et al. Ineffective erythropoiesis in mutant mice with deficient pyruvate kinase activity. Exp Hematol. 2005 Nov;33(11):1292–8.

51. Dacie Jv, Mollison Pl, Richardson N, et al. Atypical congenital haemolytic anaemia. Q J Med. 1953 Jan;22(85):79–98.

52. Selwyn Jg, Dacie Jv. Autohemolysis and other changes resulting from the incubation in vitro of red cells from patients with congenital hemolytic anemia. Blood. 1954 May;9(5):414–38.

53. Alving As, Carson Pe, Flanagan Cl, et al. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. Science. 1956 Sep 14;124(3220):484–5.

54. Valentine Wn, 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.

55. De Gruchy Gc, Santamaria Jn, Parsons Ic, et al. Nonspherocytic congenital hemolytic anemia. Blood. 1960 Oct;16:1371–97.

56. Tanaka Kr, Valentine Wn, Miwa S. Pyruvate kinase (PK) deficiency hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. Blood. 1962 Mar;19:267–95.

57. Bowman Hs, Procopio F. Hereditary non-spherocytic hemolytic anemia of the pyruvate-kinase deficient type. Ann Intern Med. 1963 Apr;58:567–91.

58. Zanella A, Bianchi P. Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations. Baillières Best Pr Res Clin Haematol. 2000 Mar;13(1):57–81.

59. Da Costa L. Anémies hémolytiques du nouveau-né. EMC - Pédiatrie - Mal Infect. 2011;

60. Loustau V, Guillaud C, Garcon L, et al. Anémie hémolytique chez l'adulte : principales causes et démarche diagnostique. Presse Médicale. 2011 May;40(5):470–85.

61. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, et al. International Committee for Standardization in Haematology: Recommended Methods for Red-Cell Enzyme Analysis*. Br J Haematol. 1977;35(2):331–40.

62. Kahn A, Boyer C, Cottreau D, et al. Immunologic study of the age-related loss of activity of six enzymes in the red cells from newborn infants and adults--evidence for a fetal type of erythrocyte phosphofructokinase. Pediatr Res. 1977 Apr;11(4):271–6.

63. Magnani M, Piatti E, Serafini N, et al. The age-dependent metabolic decline of the red blood cell. Mech Ageing Dev. 1983 Jul;22(3–4):295–308.

64. Beutler E. Red cell metabolism : a manual of biochemical methods. New York, Etats-Unis: Grune & Stratton; 1971.

65. Max-Audit I. Pyruvate kinase. EMC - Biologie médicale. 2003;90–10–0820.

66. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med. 1976 Aug;88(2):328–33.

67. Beutler E, Gelbart T. The mechanism of removal of leukocytes by cellulose columns. Blood Cells. 1986;12(1):57–64.

68. Satoh H, Tani K, Yoshida MC, et al. The human liver-type pyruvate kinase (PKL) gene is on chromosome 1 at band q21. Cytogenet Cell Genet. 1988;47(3):132–3.

69. Marie J, Simon MP, Dreyfus JC, Kahn A. One gene, but two messenger RNAs encode liver L and red cell L' pyruvate kinase subunits. Nature. 1981 Jul 2;292(5818):70–2.

70. Kanno H, Fujii H, Miwa S. Structural analysis of human pyruvate kinase L-gene and identification of the promoter activity in erythroid cells. Biochem Biophys Res Commun. 1992 Oct 30;188(2):516–23.

71. Tani K, Fujii H, Nagata S, Miwa S. Human liver type pyruvate kinase: complete amino acid sequence and the expression in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci. 1988 Mar 1;85(6):1792–5.

72. Lenzner C, Nürnberg P, Jacobasch G, et al. Complete genomic sequence of the human PK-L/R-gene includes four intragenic polymorphisms defining different haplotype backgrounds of normal and mutant PK-genes. DNA Seq J DNA Seq Mapp. 1997;8(1-2):45–53.

73. Bianchi P, Zanella A. Hematologically important mutations: red cell pyruvate kinase (Third update). Blood Cells Mol Dis. 2000 Feb;26(1):47–53.

74. Baronciani L, Magalhães IQ, Mahoney DH Jr, et al. Study of the molecular defects in pyruvate kinase deficient patients affected by nonspherocytic hemolytic anemia. Blood Cells Mol Dis. 1995;21(1):49–55.

75. Zanella A, Bianchi P, Baronciani L, et al. Molecular characterization of PK-LR gene in pyruvate kinase-deficient Italian patients. Blood. 1997 May 15;89(10):3847–52.

76. Lenzner C, Nurnberg P, Thiele BJ, et al. Mutations in the pyruvate kinase L gene in patients with hereditary hemolytic anemia. Blood. 1994 May 15;83(10):2817–22.

77. Kanno H, Fujii H, Hirono A, et al. Identical point mutations of the R-type pyruvate kinase (PK) cDNA found in unrelated PK variants associated with hereditary hemolytic anemia. Blood. 1992 Mar 1;79(5):1347–50.

78. Institute of Medical Genetics in Cardiff. The Human Gene Mutation Database [Internet]. Biobase, Biological Databases; Available from: http://www.hgmd.cf.ac.uk/

79. Zanella A, Fermo E, Bianchi P, et al. Pyruvate kinase deficiency: The genotype-phenotype association. Blood Rev. 2007 juillet;21(4):217–31.

80. Coulombel L, Tchernia G, Mohandas N. Human reticulocyte maturation and its relevance to erythropoietic stress. J Lab Clin Med. 1979 Sep;94(3):467–74.

81. Lainey E, Boirie M, Fenneteau O. Hémogramme en pédiatrie : variations physiologiques. Rev Francoph Lab. 2009 Nov;2009(416):49–59.

82. Kedar P, Hamada T, Warang P, et al. Spectrum of novel mutations in the human PKLR gene in pyruvate kinase-deficient Indian patients with heterogeneous clinical phenotypes. Clin Genet. 2009 Feb;75(2):157–62.

83. Baronciani L, Beutler E. Analysis of pyruvate kinase-deficiency mutations that produce nonspherocytic hemolytic anemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 May 1;90(9):4324–7.

84. Manco L, Ribeiro ML, Máximo V, et al.. A new PKLR gene mutation in the R-type promoter region affects the gene transcription causing pyruvate kinase deficiency. Br J Haematol. 2000 Sep;110(4):993–7.

85. Baronciani L, Bianchi P, Zanella A. Hematologically important mutations: red cell pyruvate kinase (2nd update). Blood Cells Mol Dis. 1998 Sep;24(3):273–9.

86. Pissard S, Max-Audit I, Skopinski L, et al. Pyruvate kinase deficiency in France: a 3-year study reveals 27 new mutations. Br J Haematol. 2006 Jun;133(6):683–9.

87. Kanno H, Ballas SK, Miwa S, et al. Molecular abnormality of erythrocyte pyruvate kinase deficiency in the Amish. Blood. 1994 Apr 15;83(8):2311–6.

88. Zarza R, Alvarez R, Pujades A, et al. Molecular characterization of the PK-LR gene in pyruvate kinase deficient Spanish patients. Red Cell Pathology Group of the Spanish Society of Haematology (AEHH). Br J Haematol. 1998 Nov;103(2):377–82.

89. Titapiwatanakun R, Hoyer JD, Crain K, et al. Relative red blood cell enzyme levels as a clue to the diagnosis of pyruvate kinase deficiency. Pediatr Blood Cancer. 2008 Dec;51(6):819–21.

90. Zarza R, Moscardó M, Alvarez R, et al. Co-existence of hereditary spherocytosis and a new red cell pyruvate kinase variant: PK mallorca. Haematologica. 2000 Mar;85(3):227–32.

91. Fermo E, Bianchi P, Chiarelli LR, et al. Red cell pyruvate kinase deficiency: 17 new mutations of the PK-LR gene. Br J Haematol. 2005 Jun;129(6):839–46.

92. Demina A, Varughese KI, Barbot J, et al. Six previously undescribed pyruvate kinase mutations causing enzyme deficiency. Blood. 1998 Jul 15;92(2):647–52.

93. Rouger H, Valentin C, Craescu CT, et al. Five unknown mutations in the LR pyruvate kinase gene associated with severe hereditary nonspherocytic haemolytic anaemia in France. Br J Haematol. 1996 Mar;92(4):825–30.

94. Mentzer WC Jr, Baehner RL, Schmidt-Schönbein H, et al.Selective reticulocyte destruction in erythrocyte pyruvate kinase deficiency. J Clin Invest. 1971 Mar;50(3):688–99.

95. Matsumoto N, Ishihara T, Nakashima K, et al. Sequestration and destruction of reticulocyte in the spleen in pyruvate kinase deficiency hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi J Jpn Haematol Soc. 1972 Aug;35(4):525–37.

96. Beutler E, Forman L, Rios-Larrain E. Elevated pyruvate kinase activity in patients with hemolytic anemia due to red cell pyruvate kinase "deficiency."Am J Med. 1987 Nov;83(5):899–904.

97. Zanella A, Fermo E, Bianchi P, et al. Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. Br J Haematol. 2005 Jul;130(1):11–25.

98. Kanno H, Fujii H, Tsujino G, et al. Molecular basis of impaired pyruvate kinase isozyme conversion in erythroid cells: a single amino acid substitution near the active site and decreased mRNA content of the R-type PK. Biochem Biophys Res Commun. 1993 Apr 15;192(1):46–52.

99. Duncan JR, Potter CB, Cappellini MD, et al. Aplastic crisis due to parvovirus infection in pyruvate kinase deficiency. Lancet. 1983 Jul 2;2(8340):14–6.

100. Fanning J, Hinkle RS. Pyruvate kinase deficiency hemolytic anemia: two successful pregnancy outcomes. Am J Obstet Gynecol. 1985 Oct 1;153(3):313–4.

101. Dolan LM, Ryan M, Moohan J. Pyruvate kinase deficiency in pregnancy complicated by iron overload. BJOG Int J Obstet Gynaecol. 2002 Jul;109(7):844–6.

102. Wax JR, Pinette MG, Cartin A, et al. Pyruvate kinase deficiency complicating pregnancy. Obstet Gynecol. 2007 Feb;109(2 Pt2):553–5.

103. Hennekam RC, Beemer FA, Cats BP, et al. Hydrops fetalis associated with red cell pyruvate kinase deficiency. Genet Couns Geneva Switz. 1990;1(1):75–9.

104. Ferreira P, Morais L, Costa R, et al. Hydrops fetalis associated with erythrocyte pyruvate kinase deficiency. Eur J Pediatr. 2000 Jul;159(7):481–2.

105. Raphaël MF, Van Wijk R, Schweizer JJ, et al. Pyruvate kinase deficiency associated with severe liver dysfunction in the newborn. Am J Hematol. 2007 Nov;82(11):1025–8.

106. Nakashima K. Further evidence of molecular alteration and aberration of erythrocyte pyruvate kinase. Clin Chim Acta. 1974 Sep 16;55(2):245–54.

107. Staal GE, Rijksen G, Vlug AM, et al.Extreme deficiency of L-type pyruvate kinase with moderate clinical expression. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 1982 Feb 5;118(2-3):241–53.

108. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science. 2004 Dec 17;306(5704):2090–3.

109. Ramirez J-M, Schaad O, Durual S, et al. Growth differentiation factor 15 production is necessary for normal erythroid differentiation and is increased in refractory anaemia with ring-sideroblasts. Br J Haematol. 2009 Jan;144(2):251–62.

110. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. Nat Med. 2007 Sep;13(9):1096–101.

111. Finkenstedt A, Bianchi P, Theurl I, et al. Regulation of iron metabolism through GDF15 and hepcidin in pyruvate kinase deficiency. Br J Haematol. 2009;144(5):789–93.

112. Domenico ID, Ward DM, Langelier C, et al. The Molecular Mechanism of Hepcidin-mediated Ferroportin Down-Regulation [Internet]. [cited 2013 Nov 6]. Available from: http://www.molbiolcell.org

113. Pootrakul P, Vongsmasa V, La-ongpanich P, et al. Serum ferritin levels in thalassemias and the effect of splenectomy. Acta Haematol. 1981;66(4):244–50.

114. HAS. Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare (PNDS), Juin 2008 : Syndromes thalassémiques majeurs et intermédiaires [Internet]. 2008. Available from: http://www.has-sante.fr.

115. Warang P, Kedar P, Ghosh K, et al. Molecular and clinical heterogeneity in pyruvate kinase deficiency in India. Blood Cells Mol Dis. 2013 Oct;51(3):133–7.

116. Manco L, Abade A. Pyruvate kinase deficiency: prevalence of the 1456C-->T mutation in the Portuguese population. Clin Genet. 2001 Dec;60(6):472–3.

117. Manco L, Ribeiro ML, Almeida H, et al. PK-LR gene mutations in pyruvate kinase deficient Portuguese patients. Br J Haematol. 1999 Jun;105(3):591–5.

118. Yavarian M, Karimi M, Shahriary M, et al. Prevalence of pyruvate kinase deficiency among the south Iranian population: quantitative assay and molecular analysis. Blood Cells Mol Dis. 2008 Jun;40(3):308–11.

119. El-Hazmi MA, Al-Swailem AR, Al-Faleh FZ, et al. Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase and hexokinase deficiency in the Saudi population. Hum Hered. 1986;36(1):45–9.

120. Lenzner C, Nürnberg P, Jacobasch G, et al. Molecular analysis of 29 pyruvate kinase-deficient patients from central Europe with hereditary hemolytic anemia. Blood. 1997 Mar 1;89(5):1793–9.

121. Fung RH, Keung YK, Chung GS. Screening of pyruvate kinase deficiency and G6PD deficiency in Chinese newborn in Hong Kong. Arch Dis Child. 1969 Jun;44(235):373–6.

122. Rider NL, Strauss KA, Brown K, et al. Erythrocyte pyruvate kinase deficiency in an old-order Amish cohort: longitudinal risk and disease management. Am J Hematol. 2011 Oct;86(10):827–34.

123. May J, Meyer CG, Grossterlinden L, et al. Red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase status and pyruvate kinase activity in a Nigerian population. Trop Med Int Heal TM IH. 2000 Feb;5(2):119–23.

124. Kanno H, Wei DC, Chan LC, et al. Hereditary hemolytic anemia caused by diverse point mutations of pyruvate kinase gene found in Japan and Hong Kong. Blood. 1994 Nov 15;84(10):3505–9.

125. Zaucha JA, Yu C, Lothrop CD Jr, et al. Severe canine hereditary hemolytic anemia treated by nonmyeloablative marrow transplantation. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant. 2001;7(1):14–24.

126. Weiden PL, Hackman RC, Deeg HJ, et al. Long-term survival and reversal of iron overload after marrow transplantation in dogs with congenital hemolytic anemia. Blood. 1981 Jan;57(1):66–70.

127. Morimoto M, Kanno H, Asai H, et al. Pyruvate kinase deficiency of mice associated with nonspherocytic hemolytic anemia and cure of the anemia by marrow transplantation without host irradiation. Blood. 1995 Dec 1;86(11):4323–30.

128. Tanphaichitr VS, Suvatte V, Issaragrisil S, et al. Successful bone marrow transplantation in a child with red blood cell pyruvate kinase deficiency. Bone Marrow Transplant. 2000 Sep;26(6):689–90.

129. Kanno H, Utsugisawa T, Aizawa S, et al. Transgenic rescue of hemolytic anemia due to red blood cell pyruvate kinase deficiency. Haematologica. 2007 Jun;92(6):731–7.

130. Meza NW, Alonso-Ferrero ME, Navarro S, et al. Rescue of Pyruvate Kinase Deficiency in Mice by Gene Therapy Using the Human Isoenzyme. Mol Ther. 2009 Dec;17(12):2000–9.

131. Tani K, Yoshikubo T, Ikebuchi K, et al. Retrovirus-mediated gene transfer of human pyruvate kinase (PK) cDNA into murine hematopoietic cells: implications for gene therapy of human PK deficiency. Blood. 1994 Apr 15;83(8):2305–10.

132. Meza NW, Quintana-Bustamante O, Puyet A, et al. In vitro and in vivo expression of human erythrocyte pyruvate kinase in erythroid cells: a gene therapy approach. Hum Gene Ther. 2007 Jun;18(6):502–14.

133. Trobridge GD, Beard BC, Wu RA, Ironside C, Malik P, Kiem H-P. Stem cell selection in vivo using foamy vectors cures canine pyruvate kinase deficiency. PloS One. 2012;7(9):e45173.

134. INSERM. Forces de la recherche - Registres. http://www.inserm.fr/qu-est-ce-que-l-inserm/forces-de-la-recherche/registres; 2013.

135. Arrêté du 6 novembre 1995 relatif au Comité national des registres [Internet]. Available from: http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=LEGITEXT000005619815

136. Comité interministériel pour la modernisation de l'action publique. Relevé de décisions [Internet]. 2013. Available from: http://www.economie.gouv.fr/files/files/directions_services/sae/20130402_releve_decisions_CIMAP.pdf

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les moeurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.