HAL
open science

Caractérisation biochimique du rôle de l'HNE et de la Lf dans le contexte inflammatoire de la drépanocytose.

Clara Allayous, Therese Marianne-Pepin

To cite this version:

Clara Allayous, Therese Marianne-Pepin. Caractérisation biochimique du rôle de l'HNE et de la Lf dans le contexte inflammatoire de la drépanocytose.. 2007. hal-00201470

HAL Id: hal-00201470

https://hal.science/hal-00201470

Preprint submitted on 29 Dec 2007

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.

Caractérisation biochimique du rôle de l'HNE et de la Lf dans le contexte inflammatoire de la drépanocytose.

C. Allayous et T. Marianne-Pepin*

*Corresponding author

Laboratoire Dynamique des Protéines et Modélisation

Université des Antilles et de la Guyane

Département de Biologie – UFR SEN

97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France (F.W.I.)

Tel: +590 590 483 062

Fax: +590 590 483 065

E-mail address: tmariann@univ-ag.fr (T. Marianne-Pepin).

Résumé

L'HNE et la Lf sont des protéines particulières car impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques différents, connues comme des marqueurs de l'inflammation (inflammations pulmonaires et maladie de Crohn). Nous avons déterminé leur mécanisme d'action dans le cadre de la drépanocytose, une maladie génétique particulièrement polymorphe.

Nous avons montré la présence de mutations inédites des gènes codant ces deux protéines dans le cas de la drépanocytose, mutations pouvant affecter le niveau d'expression et la structure de ces protéines.

Des études sont en cours actuellement pour déterminer l'effet de ces mutations.

I - Introduction

L'élastase des neutrophiles humains (HNE) et la lactoferrine plasmatique (Lf) sont deux protéines secrétées par les neutrophiles, respectivement à partir des granules azurophiles et les granules secondaires dont le niveau de sécrétion indique l'activation des neutrophiles (Olsson et al. 1988; Pham. 2006; Schultz and Kaminker. 1962; Spitznagel et al. 1974). (Belaaouaj et al. 1998a; Lee and Downey. 2001; Olsson et al. 1988; Schultz and Kaminker. 1962; Spitznagel et al. 1974). En plus de leur rôle dans le système inflammatoire, ces protéines interviennent dans différents systèmes, montrant ainsi leur dynamique fonctionnelle (Baveye et al. 1999; Belaaouaj et al. 1998b; Belaaouaj. 2002; Brock. 2002; Broxmeyer et al. 1978; Floris et al. 2003; Lorget et al. 2002; Oseas et al. 1981; Owen and Campbell. 1999; Pham. 2006; Shi et al. 2000; Snick et al. 1974; Sonawane et al. 2006; Weinrauch et al. 2002).
Elles sont de plus connues comme marqueurs de maladies inflammatoires pulmonaires (HNE) et intestinales comme la maladie de Crohn (Lf) (Greene et al. 2003; Kawabata et al. 2002; Kayazawa et al. 2002; Kodama et al. 2007; Matsuse et al. 2007; Moraes et al. 2003; Ohbayashi. 2002).

La maladie drépanocytaire se caractérise par un état d'inflammation chronique associé avec une grande variabilité d'expression clinique. Aussi avons-nous choisi ce cadre pour étudier le rôle de ces deux protéines en particulier et pour la première fois montrer qu'elles pourraient être à l'origine de la variabilité phénotypique, d'où une confirmation de leur rôle de marqueurs dans cette maladie. Pour cela, nous avons choisi de rechercher si les différences d'expression retrouvées pourraient être corrélées à différents polymorphismes géniques, notamment au niveau du promoteur, des introns et/ou des exons décrits dans ces deux gènes et liés à des pathologies (Ancliff et al. 2001; Ancliff et al. 2003; Brock. 2002; Furmanski and Li.

1990; Furmanski et al. 1989; Horwitz et al. 1999; Horwitz et al. 2007; Jordan et al. 2005; Lee and Downey. 2001; Panella et al. 1991; Penco et al. 1999; Salipante et al. 2007; Siebert and Huang. 1997; Taniguchi et al. 2002; Teng and Gladwell. 2006; Teng. 2002; Thomas et al. 2006; Velliyagounder et al. 2003).

Ces deux protéines possèdent ainsi une dynamique structurale et fonctionnelle particulière. Il apparaît alors intéressant de déterminer leur mode d'action et de vérifier si les mécanismes moléculaires passent par un défaut d'expression génique, dans le cadre de la drépanocytose.

II - Matériel et Méthodes

1 - Population d'étude

La population d'étude est constituée de patients SS asymptomatiques, de patients SS ayant des crises CVO, de patients ayant présentés des infections ainsi que des témoins normaux volontaires, ce qui représente une population totale d'une cinquantaine de patients.

La crise vaso-occlusive ou CVO est définie comme un épisode de douleur aigue dans l'abdomen et ou aux extrémités, accompagné de signe d'une augmentation de l'hémolyse. Seuls les patients ayant eu au moins deux épisodes infectieux (septicémie, méningite, ostéomyélite, infection pulmonaire) ont été inclus dans l'étude. Aucun des patients inclus dans cette étude ne sont sous traitement. Chacun des patients ont donné leur accord selon les protocoles établis par le Centre de Drépanocytose de l'hôpital du Lamentin, en Martinique. Cette étude a obtenue l'accord du Comité d'Ethique Régional (Projet de recherche « Polymorphisme de gènes de l'immunité susceptibles d'être impliqués dans les complications majeures de la drépanocytose », projet n°06-02, du 17 Août 2006).

2 - Echantillons de sang

Les échantillons de sang veineux ont été obtenus de patients drépanocytaires et de volontaires sains, pour les patients asymptomatiques au cours de visite de routine. Ces échantillons de sang (EDTA) ont été immédiatement conservés dans de la glace (4°C).

3 - Amplification génétique de l'HNE et de la Lf par PCR

L'ADN a été extrait des leucocytes du sang périphérique en utilisant la méthode d'extraction au phénol-chloroforme (Bienvenu et al. 1999; Sambrook et al. 1989).

Pour HNE, trois fragments d'ADN couvrant les 5 exons d'ELA2 et au moins 15 bases des régions flanquantes ont été amplifiés par PCR (Ancliff et al. 2001). Parmi les 17 fragments d'ADN génomique couvrant la totalité de la région codante du gène codant la Lf, nous avons choisi d'amplifier 7 exons contenant des polymorphismes ponctuels de nucléotides de la forme SNP (Single Nucleotide Polymorphism), préalablement décrits (Teng and Gladwell. 2006).

Les différentes amorces utilisées (Proligo, France) sont présentées dans les tableaux 1 (HNE) et 2 (Lf).

La réaction PCR est réalisée dans 25 µl de tampon approprié et complet (PCR Master Mix 2X, Reference M7502, Promega), contenant la Taq Polymérase (0,625 unités), les amorces (10 µM) et l'ADN (1 µg), selon Ancliff et al. (2001) pour l'HNE et Iijima et al. (2006) pour la Lf.

4 - Séquençage et analyse de mutations :

Les produits de PCR sont séquencés dans les deux sens avec les amorces précédemment utilisées (Millegen, France). Les séquences obtenues sont alors comparées avec des séquences connues provenant des banques de données du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI). Les comparaisons de séquences sont effectuées avec deux programmes, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/; (Altschul et al. 1997)) et ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/; (Higgins et al. 1996)), à partir des séquences références du gène ELA2 (GenBank accession number AC Y00477; (Nakamura et al. 1987)) et du gène Lf (GenBank entry NM 002343; (Sabatucci et al. 2007)).

La traduction des séquences nucléotidiques obtenues ont été réalisées en utilisant le programme «Expasy Translate Tool» (http://www.expasy.org/tools/dna.html). Les séquences protéiques résultantes ont été comparées avec la séquence protéique de référence (ELA2 : GenBank accession number AC Y00477; (Nakamura et al. 1987) ; Lf : GenBank entry NM 002343; (Sabatucci et al. 2007)) en utilisant le programme ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/; (Higgins et al. 1996)).

Des prédictions de structure ont été réalisées sur chacune des séquences obtenues, en utilisant le SWISS-Model (Guex and Peitsch. 1997; Peitsch. 1995; Schwede et al. 2003).

Les prédictions de sites donneurs et accepteurs d'épissage ont été réalisées en utilisant le programme « Splice Site Prediction » du projet « Berkeley Drosophila Genome Project » (BDGP) (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

III – Résultats et discussion

1 - Gène codant l'HNE

Les cinq exons du gène ELA2 ont été amplifiés (figure 1) et séquencés (figures 2 et 3).

Après avoir comparé chacune des séquences d'ADN obtenues avec une séquence référence comme précisé dans la partie « Matériels et Méthodes », aucune mutation n'a été mise en évidence dans les parties codantes du gène. Par contre, différentes mutations dans les introns 2, 3 et 4 chez différents patients SS infectieux ont été détectées (figures 2 et 3). Une étude supplémentaire a permis de rechercher si ces mutations ont lieu au niveau de sites-clés de l'épissage (figures 4 et 5).

Cela semble être le cas des mutations situées en fin d'intron 2 (figure 4) et d'intron 3 (figure 5), qui correspondraient à un site accepteur d'épissage. Les autres mutations rencontrées se situent en amont ou à la proximité de sites d'épissages (figures 2 et 3). Ces résultats n'ont jamais encore été décrits dans le cadre de la drépanocytose.

2 - Gène codant la Lf

Les 6 exons du gène Lf présentant le plus de polymorphismes de type SNP connus ont été amplifiés (figure 6) et séquencés (figures 7 et 8).

a) Séquences nucléotidiques

La comparaison de nos résultats avec une séquence de référence montrent la présence de polymorphismes dans l'exon 2 (individu témoin et patient SS infectieux) et l'exon 15 (patient SS infectieux).

L'alignement des séquences obtenues pour l'exon 2 est présenté dans la figure 9. Nos résultats montrent une mutation représentée par une insertion des trois nucléotides GAA, en position 103, 104 et 105 dans les séquences obtenues à partir des produits de PCR. Deux autres mutations sont également retrouvées. Elles correspondent à des substitutions, G→A en position 123 et A→G en position 178. Ces mutations sont les mêmes pour les deux séquences testées.

L'alignement des séquences obtenues pour l'exon 15 est présenté dans la figure 10. Deux types de mutations sont observés chez ce patient. Une mutation correspondant à la délétion du nucléotide A en position 1771 et une mutation correspondant à la substitution du nucléotide T par le nucléotide C, en position 1932.

Ce sont les premiers travaux de ce type dans le cadre de patients drépanocytaires.

b) Séquences protéiques

A partir des séquences d'ADN complète (séquences de référence), les séquences protéiques de la lactoferrine du témoin AA (mutation dans l'exon 2 ; figure 9) et du patient SS infectieux (mutations de l'exon 2 et 15 ; figure 10), ont été réalisées avec le programme de traduction « Expasy Translate Tool) (cf. Matériel et Méthodes).

Les différents changements obtenus au niveau de la prédiction de la protéine sont résumés dans le tableau 3.

Chez l'individu témoin, les mutations retrouvées dans l'exon 2 aboutissent à la prédiction d'une protéine mutée de 711 acides aminés. Elle se caractérise par l'insertion de l'arginine en position 24 et de deux mutations ponctuelles pour lesquelles l'alanine est remplacé par la thréonine (A30T) et la lysine est remplacé par l'arginine (K48R) (figure 9).

Chez le patient SS infectieux, les mutations retrouvées dans l'exon 2 aboutissent aux mêmes prédictions que précédemment, cependant, la protéine mutée obtenue possède 585 acides aminés. De plus, les mutations générées dans l'exon 15 sont à la base d'une modification du cadre de lecture aboutissant à la perte de plusieurs acides aminés situés en position C-Terminale (figure 10).

Le patient SS infectieux présente les mêmes mutations ponctuelles dans l'exon 2 que chez l'individu sain. Par contre, les mutations de l'exon 15 associées aux mutations de l'exon 2 sont des résultats inédits chez les patient drépanocytaires. Teng et al. (2006) ont d'ailleurs décrits les mutations de l'exon 2 (insertion 24R ; A30Tet K48R) où l'insertion 24R est retrouvée dans 99% des cas et la référence utilisée (matériel et méthodes) est considérée comme un allèle présent dans 1% de la population, ce qui ne modifie pas le cadre de lecture (Teng and Gladwell. 2006).

IV – Discussion

Cette différence de comportement des protéines pourrait être reliée à des mécanismes moléculaires à l'origine de défauts d'expression génétiques et/ou de sécrétion. En effet, de nombreux polymorphismes exoniques et introniques de l'HNE ont été décrits associés à des maladies cardiaques (Rudolph et al. 2007; Schonfelder et al. 2007) ou a des neutropénies congénitales.

Pour le gène de la Lf, de nombreux polymorphismes ponctuels de type SNP ont été mis en évidence au niveau de certains exons ainsi que dans le promoteur. Ces mutations sont

également associées à la survenue de certaines pathologies (« Turista ») (Mohamed et al. 2007; Yi et al. 2006).

Pour la première fois, nos travaux montrent l'existence de polymorphismes d'HNE et de Lf chez les patients drépanocytaires. Les mutations mises en évidence pourraient être associées à des modifications fonctionnelles à l'origine de la variabilité clinique observée dans cette pathologie.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence, pour la première fois, différents polymorphismes situés dans des régions ou à proximité des régions présumées sites donneurs ou accepteurs d'épissage. Ces modifications, correspondant à des substitutions ou à des délétions de nucléotides feront l'objet de recherches plus approfondies afin de déterminer si ces modifications affectent la transcription, le déroulement de l'épissage ou la maturation de l'ARN messager (ARNm) correspondant.

De nombreux polymorphismes ponctuels, de type SNP, ont été décrits au niveau de certains exons du gène codant la Lf et de son promoteur, associées ou non à la survenue de certaines pathologies (Mohamed et al. 2007; Yi et al. 2006). Aucune étude n'a encore porté sur les patients drépanocytaires.

Nos travaux confirment l'existence de deux mutations ponctuelles de type SNP dans l'exon 2 chez un individu sain (Teng and Gladwell. 2006) et décrivent pour la première fois des mutations au niveau de l'exon 15 chez un malade drépanocytaire. Ces dernières traduisent une modification du cadre de lecture lors de la transcription, aboutissant au niveau de la prédiction protéique, à l'insertion d'un codon stop, et donc à une protéine tronquée dans sa partie C-Terminale.

Ce travail offre de nombreuses perspectives, tant sur la compréhension du schéma physiopathologique de la drépanocytose que sur la dynamique structurale et fonctionnelle de l'HNE et de la Lf.

Nos résultats pourront être étayés par des études en cours actuellement concernant la structure de l'ARNm, sa maturation et sa stabilité, sur la relations entre la séquence génétique et la traduction protéique ainsi que sur la structure et la fonction de la protéine finale.

V - Références bibliographiques

1. **Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 17: 3389-3402, 1997.
2. **Ancliff PJ, Gale RE, Liesner R, Hann IM and Linch DC.** Mutations in the ELA2 gene encoding neutrophil elastase are present in most patients with sporadic severe congenital neutropenia but only in some patients with the familial form of the disease. 98: 9: 2645-2650, 2001.
3. **Ancliff PJ, Gale RE and Linch DC.** Neutrophil elastase mutations in congenital neutropenia. 8: 3: 165-171, 2003.
4. **Baveye S, Elass E, Mazurier J, Spik G and Legrand D.** Lactoferrin: a multifunctionnal glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. 37: 281-286, 1999.
5. **Belaaouaj A.** Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. *Microbes Infect.* 4: 12: 1259-1264, 2002.

6. **Belaaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN and Shapiro SD.** Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat. Med.* 4: 5: 615-618, 1998a.

7. **Belaaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN and Shapiro SD.** Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat. Med.* 4: 5: 615-618, 1998b.

8. **Bienvenu T, Meunier C, Bousquet S, Chiron S, Richard L, Gautheret-Dejean A, Rouselle JF and Feldmann D.** Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. *Annales de Biologie Clinique* 57: 1: 77-84, 1999.

9. **Brock JH.** The physiology of lactoferrin. 80: 1-6, 2002.

10. **Broxmeyer HE, Smithyman A, Eger RR, Meyers PA and Sousa MD.** Identification of lactoferrin as the granulocyte-derived inhibitor of colony-stimulating activity production. 148: 4: 1052-1067, 1978.

11. **Carpentieri U, Brouhard BH, LaGrone L, Smith L and Daeschner CW.** Lactoferrin (LF), prostaglandin E (PGE) and neutrophils in children with sickle cell disease (SCD). 50: 1: 57-58, 1985.

12. **Floris R, Recio I, Berkhout B and Visser S.** Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. 9: 16: 1257-1275, 2003.

13. **Furmanski P, Li ZP, Fortuna MB, Swamy CV and Das MR.** Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity. 170: 2: 415-429, 1989.

14. **Furmanski P and Li Z.** Multiple forms of lactoferrin in normal and leukemic human granulocytes. 18: 932-935, 1990.

15. **Greene C, Taggart C, Lowe G, Gallagher P, McElvaney N and O'Neill S.** Local impairment of anti-neutrophil elastase capacity in community-acquired pneumonia. *J. Infect. Dis.* 188: 5: 769-776, 2003.

16. **Guex N and Peitsch MC.** SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723, 1997.

17. **Higgins DG, Thompson JD and Gibson TJ.** Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.* 266: 383-402, 1996.

18. **Horwitz M, Benson KF, Person RE, Aprikyan AG and Dale DC.** Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat. Genet.* 23: 4: 433-436, 1999.

19. **Horwitz MS, Duan Z, Korkmaz B, Lee HH, Mealiffe ME and Salipante SJ.** Neutrophil elastase in cyclic and severe congenital neutropenia. *Blood* 109: 5: 1817-1824, 2007.

20. **Iijima H, Tomizawa Y, Iwasaki Y, Sato K, Sunaga N, Dobashi K, Saito R, Nakajima T, Minna JD and Mori M.** Genetic and epigenetic inactivation of LTF gene at 3p21.3 in lung cancers. *Int. J. Cancer* 118: 4: 797-801, 2006.

21. **Jordan WJ, Eskdale J, Lennon GP, Pestoff R, Wu L, Fine DH and Gallagher G.** A non-conservative, coding single-nucleotide polymorphism in the N-terminal region of lactoferrin is associated with aggressive periodontitis in an African-American, but not a Caucasian population. *Genes Immun.* 6: 7: 632-635, 2005.

22. **Kawabata K, Hagio T and S.Matsuoka.** The role of neutrophil elastase in acute lung injury. 451: 1-10, 2002.

23. **Kayazawa M, Saitoh O, Kojima K, Nakagawa K, Tanaka S, Tabata K, Matsuse R, Uchida K, Hoshimoto M, Hirata I and Katsu K.** Lactoferrin in whole gut lavage

fluid as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: comparison with other neutrophil-derived proteins. 97: 360-369, 2002.

24. **Kodama T, Yukioka H, Kato T, Kato N, Hato F and Kitagawa S.** Neutrophil elastase as a predicting factor for development of acute lung injury. *Intern. Med.* 46: 11: 699-704, 2007.

25. **Lee WL and Downey GP.** Leucocyte Elastase. Physiological functions and role in acute lung injury. 164: 896-904, 2001.

26. **Lorget F, Clough J, Oliveira M, Daury MC, Sabokbar A and Offord E.** Lactoferrin reduces in vitro osteoclast differentiation and resorbing activity. 296: 2: 261-266, 2002.

27. **Matsuse H, Yanagihara K, Mukae H, Tanaka K, Nakazato M and Kohno S.** Association of plasma neutrophil elastase levels with other inflammatory mediators and clinical features in adult patients with moderate and severe pneumonia. *Respir. Med.* 101: 7: 1521-1528, 2007.

28. **Mohamed JA, DuPont HL, Jiang ZD, Belkind-Gerson J, Figueroa JF, Armitige LY, Tsai A, Nair P, Martinez-Sandoval FJ, Guo DC, Hayes P and Okhuysen PC.** A novel single-nucleotide polymorphism in the lactoferrin gene is associated with susceptibility to diarrhea in North American travelers to Mexico. *Clin. Infect. Dis.* 44: 7: 945-952, 2007.

29. **Moraes TJ, Chow C and Downey GP.** Proteases and lung injury. 31: 4: S189-S194, 2003.

30. **Nakamura H, Okano K, Aoki Y, Shimizu H and Naruto M.** Nucleotide sequence of human bone marrow serine protease (medullasin) gene. *Nucleic Acids Res.* 15: 22: 9601-9602, 1987.

31. **Ohbayashi H.** Novel neutrophil elastase inhibitors as a treatment for neutrophil-predominant inflammatory lung diseases. 5: 9: 910-293, 2002.

32. **Olsson I, Lantz M, Persson AM and Arnljots K.** Biosynthesis and processing of lactoferrin in bone marrow cells, a comparison with processing of myeloperoxidase. *Blood* 71: 2: 441-447, 1988.

33. **Oseas R, Yang HH, Baehner RL and Boxer LA.** Lactoferrin: a promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. 57: 5: 939-945, 1981.

34. **Owen CA and Campbell EJ.** The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. 65: 2: 137-150, 1999.

35. **Panella TJ, Liu Y, Huang AT and Teng CT.** Polymorphism and altered methylation of the lactoferrin gene in normal leucocytes, leukemic cells, and breast cancer. 51: 3037-3043, 1991.

36. **Peitsch MC.** Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology* 13: 658-660, 1995.

37. **Penco S, Caligo MA, Cipollini G, Bevilacqua G and Garrè C.** Lactoferrin expression in human breast cancer. 17: 163-178, 1999.

38. **Pham CT.** Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 7: 541-550, 2006.

39. **Rudolph V, Rudolph TK, Hennings JC, Blankenberg S, Schnabel R, Steven D, Haddad M, Knittel K, Wende S, Wenzel J, Munzel T, Heitzer T, Meinertz T, Hubner C and Baldus S.** Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function. *Free Radic. Biol. Med.* 43: 8: 1189-1196, 2007.

40. **Sabatucci A, Vachette P, Vasilyev VB, Beltramini M, Sokolov A, Pulina M, Salvato B, Angelucci CB, Maccarrone M, Cozzani I and Dainese E.** Structural

characterization of the ceruloplasmin: lactoferrin complex in solution. *J. Mol. Biol.* 371: 4: 1038-1046, 2007.

41. **Salipante SJ, Benson KF, Luty J, Hadavi V, Kariminejad R, Kariminejad MH, Rezaei N and Horwitz MS.** Double de novo mutations of ELA2 in cyclic and severe congenital neutropenia. *Hum. Mutat.* 28: 9: 874-881, 2007.

42. **Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T,** eds. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory., 1989.

43. **Schonfelder J, Telgmann R, Nicaud V, Brand E, Dordelmann C, Russmann C, Beining K, Schmidt-Petersen K, Evans A, Kee F, Morrison C, Arveiler D, Cambien F, Paul M and Brand-Herrmann SM.** Neutrophil elastase gene variation and coronary heart disease. *Pharmacogenet Genomics.* 17: 8: 629-637, 2007.

44. **Schultz J and Kaminker K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I.** Content and localization. *Arch. Biochem. Biophys.* 96: 465-467, 1962.

45. **Schwede T, Kopp J, Guex N and Peitsch MC.** SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31: 3381-3385, 2003.

46. **Shi Y, Kong W and Nakayama K.** Human lactoferrin binds and removes the hemoglobin receptor protein of the periodontopathogen Porphyromonas gingivalis. 275: 39: 30002-30008, 2000.

47. **Siebert PD and Huang BC.** Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines. 94: 6: 2198-2203, 1997.

48. **Snick JLV, Masson PL and Heremans JF.** The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. 140: 4: 1068-1084, 1974.

49. **Sonawane A, Jyot J, During R and Ramphal R**. Neutrophil elastase, an innate immunity effector molecule, represses flagellin transcription in Pseudomonas aeruginosa. *Infect. Immun.* 74: 12: 6682-6689, 2006.

50. **Spitznagel JK, Dalldorf FG, Leffell MS, Folds JD, Welsh IR, Cooney MH and Martin LE.** Character of azurophil and specific granules purified from human polymorphonuclear leukocytes. *Lab. Invest.* 30: 6: 774-785, 1974.

51. **Taniguchi K, Yang P, Jett J, Bass E, Meyer R, Wang Y, Deschamps C and Liu W.** Polymorphisms in the promoter region of the neutrophil elastase gene are associated with lung cancer development. 8: 4: 1115-1120, 2002.

52. **Teng CT.** Lactoferrin gene expression and regulation: an overview. 80: 7-16, 2002.

53. **Teng CT and Gladwell W.** Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in human lactoferrin gene. *Biochem. Cell. Biol.* 84: 3: 381-384, 2006.

54. **Thomas M, Jayandharan G and Chandy M.** Molecular screening of the neutrophil elastase gene in congenital neutropenia. *Indian Pediatr.* 43: 12: 1081-1084, 2006.

55. **Velliyagounder K, Kaplan JB, Furgang D, Legarda D, Diamond G, Parkin RE and Fine DH.** One of two human lactoferrin variants exhibits increased antibacterial and transcriptional activation activities and is associated with localized juvenile periodontitis. *Infect. Immun.* 71: 11: 6141-6147, 2003.

56. **Weinrauch Y, Drujan D, Shapiro SD, Weiss J and Zychlinsky A.** Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* 417: 6884: 91-94, 2002.

57. **Yi HM, Li H, Peng D, Zhang HJ, Wang L, Zhao M, Yao KT and Ren CP.** Genetic and epigenetic alterations of LTF at 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol. Res.* 16: 6: 261-272, 2006.

Tableaux

Fragment	Amorce sens	Amorce antisens
1	5'-CGGAGGGGCAGAGACCCCGGA-3'	5'-AGACCGGGACGCGGGGTCCGA-3'
2	5'-CTCGAGCACCTTCGCCCTCAG-3'	5'-TCAACGGCCCATGGCGGGTAT-3'
3	5'-CCTGCCCTGCAGGATCCCAGA-3'	5'-GGAGAGTGTGGGTGTGGGCAG-3'

Tableau 1: Séquence des amorces utilisées pour l'amplification du gène ELA2

D'après (Ancliff et al. 2001).

Exon	Amorce sens	Amorce antisens
2	5'-CGCCCTCAGTCAGTGGTTGA-3'	5'-TCCATTCAGCTTGGTCCCAA-3'
3	5'-TTGCTGGGTTTGGGTGAGTT-3'	5'-TAATCCACACAGCTCAGGGC-3'
4	5'-TTTGTCCCTCTTGTCCAGGC-3'	5'-ACAACTGGAATAGAGCCCCC-3'
5	5'-TGTAACCTGCTGTGACCAGG-3'	5'-TGAGGCCAAGGGACACTTGG-3'
10	5'-ATGCAGCCTCACTGTGGTGC-3'	5'-CCATGACCCAGAGGGAATAT-3'
12	5'-GCCTCCTGGAGGTTAAGACT-3'	5'-TCCCTAAGGTTCCACAGCAC-3'
15	5'-CGTGGATGATGCCACCTTCT-3'	5'-GCCCACACAGCTAAGAAAGC-3'

Tableau 2: Séquence des amorces utilisées pour l'amplification du gène de Lf.

D'après (Iijima et al. 2006).

A)

Exon	Individu	Type de mutation
2	Normal SS infectieux	- Insertion ^{103}GAA^{105} - Substitution G123A - Substitution A178G
15	SS infectieux	- Délétion ^{1771}A - Substitution T1932C

B)

Individu	Protéine mutée	Type de mutations obtenues
Normal	711 acides aminés	- Insertion ^{24}R - Substitution A30T - Substitution K48R
SS infectieux	585 acides aminés	- Insertion ^{24}R - Substitution A30T - Substitution K48R - Délétion en CT

Tableau 3 : Mutations du gène et de la protéine Lactoferrine.

A) Mutations au niveau du gène codant la Lf.

B) Mutations au niveau de la protéine Lactoferrine.

La mutation en rouge est le résultat des mutations retrouvées au niveau de l'exon 15 du gène codant la Lf.

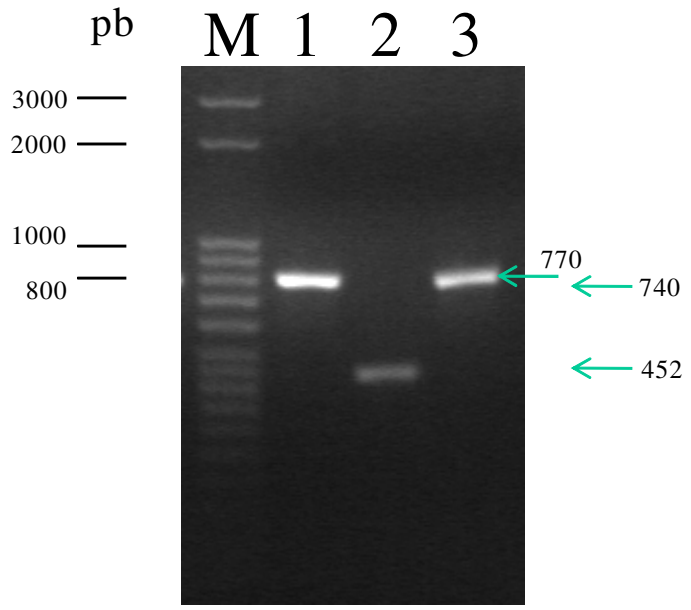

Figure 1 : Migration des produits de PCR du gène codant l'HNE.

Puits : M, Marqueur de migration de 50 pb (Sigma, n° D3812) ; 1, Amplification du fragment 2. ; 2, Amplification du fragment n°2. ; 3, Amplification du fragment n°3.

Les flèches indiquent les produits de PCR obtenus ainsi que leur taille en pb.

```
ref             GGCCCCGATCCCGTGGGTTCCCGGTGGGGGATCCAGAGGCCCCGTGGCCGGGAGGGGACA 1740
2s              ------------------------------------------------------------

ref             GGCTCCTTGGCAGGCACTCAGCACCCGCACCCGGTGTGTCCCCAGGCACCGCGCTGGCCT 1800
2s              ------------------------------------------------------------

ref             CGGAGATTGTGGGGGGCCGGCGAGCGCGGCCCCACGCGTGGCCCTTCATGGTGTCCCTGC 1860
2s              ------------------------------------------------------------

ref             AGCTGCGCGGAGGCCACTTCTGCGGCGCCACCCTGATTGCGCCCAACTTCGTCATGTCGG 1920
2s              ------------------------------------------------------------

ref             CCGCGCACTGCGTGGCGAATGTGTGAGTAGCCGGGAGTGTGCGCGCCCGGCTCGGACCCC 1980
2s              ------------------------------------------------------------

ref             GCGTCCCGGTCTGTGAGGTGGGTGGGGGGAGGCCGGGGCCGGGGCTGCTGGCGGGGGGGG 2040
2s              ------------------------------------------------------------

ref             GTCCGTCCAGGGCCCGCGGGGCCCCTCGAGCACCTTCGCCCTCAGGCCCGTCGCCGGATG 2100
2s              ------------------------------------------------------------

ref             GGGACGACAAGGCGCGGCTGAGCCCCGACCCCCGGGGCCGCCCCTGAGCCCCGCCTCTCC 2160
2s              -----ANACAGGCGCGGCTGAGCCCCGACCCCCGGGGCCGCCCCTGAGCCCCGCCTCTCC 55
                     ****************************************************

ref             CTCTTTTGGCAGAAACGTCCGCGCGGTGCGGGTGGTCCTGGGAGCCCATAACCTCTCGCG 2220
2s              CTCCCC-GGCAGAAACGTCCGCGCGGTGCGGGTGGTCCTGGGAGCCCATAACCTCTCGCG 114
                ***    ****************************************************

ref             GCGGGAGCCCACCCGGCAGGTGTTCGCCGTGCAGCGCATCTTCGAAAACGGCTACGACCC 2280
2s              GCGGGAGCCCACCCGGCAGGTGTTCGCCGTGCAGCGCATCTTCGAAAACGGCTACGACCC 174
                ************************************************************

ref             CGTAAACTTGCTCAACGACATCGTGATTCTCCAGGTGCCGCCGGGCGGGCGGGGGCGAGG 2340
2s              CGTAAACTTGCTCAACGACATCGTGATTCTCCAGGTGCCGCCGGGCGGG-----GCGGGG 229
                ************************************************      *** **

ref             GGCGGAGGCCAGAGGCCTGGGGAGGGTGGAGGCCTGGGGAGGGTGGAGGCTGCGACGGAG 2400
2s              GGCG-----CAGGGGC----GGAGGCCAGAGGCCTGGGGAGGGTGGAGGCTGCGACGGAG 280
                ****     ***  ***    *****   ********************************

ref             GGGCGCGTCGGGGCCGCTCGTGGGGACCTGGGGTGGCATCGTGGGCTGGGTGGTCCCCTC 2460
2s              GGGCGCGTCGGGGCCGCTCGTGGGGACCTGGGGTGGCATCGTGGGCTGGGTGGTCCCCTC 340
                ************************************************************

ref             TCCGCGCCTCGGTCTGCACCTCTGTGAAACGGGAAAATACCCGCCATGGGCCGTTGAGGG 2520
2s              TCCGCGCCTCGGTCTGCACCTCTGTGAAACGGGAAAATACCCGCCATGGGCCGTTGAA-- 398
                *******************************************************

ref             GTTAAATGAGATCCTGCAGGGAGGCCCCGATCTGCTGTCAATCAACAAACTTACTGAGAA 2580
2s              ------------------------------------------------------------
```

Figure 2 : Alignement de séquences nucléotidiques correspondant à la partie 2 utilisée pour l'amplification du gène ELA2.

Ref : référence ; 2s : patient SS infectieux. La séquence de l'exon 2 est en surbrillance en vert et celle de l'exon 3 en surbrillance bleue. * : alignement parfait. Les mutations sont soulignées en rouge.

```
ref             AGAACCACAGTGGAACCTGAGATGGGGAAACTGAGGCCCGGAGAGGGGAGGGTCATCATC 4440
3s              ------------------------GGGGAACTGAGGCCCGGAGAGGGGAGGGTCATCATC 36
                                        ***_*******************************

ref             ACTGCCCCGTGTGACGCGCTGACGATCTGTCCCCACCGCCACAGCTCAACGGGTCGGCCA 4500
3s              ACTGCCCCGTGTGACGCGCTGACGATCTGTCCCCACCGCCACAGCTCAACGGGTCGGCCA 96
                ************************************************************

ref             CCATCAACGCCAACGTGCAGGTGGCCCAGCTGCCGGCTCAGGGACGCCGCCTGGGCAACG 4560
3s              CCATCAACGCCAACGTGCAGGTGGCCCAGCTGCCGGCTCAGGGACGCCGCCTGGGCAACG 156
                ************************************************************

ref             GGGTGCAGTGCCTGGCCATGGGCTGGGGCCTTCTGGGCAGGAACCGTGGGATCGCCAGCG 4620
3s              GGGTGCAGTGCCTGGCCATGGGCTGGGGCCTTCTGGGCAGGAACCGTGGGATCGCCAGCG 216
                ************************************************************

ref             TCCTGCAGGAGCTCAACGTGACGGTGGTGACGTCCCTCTGCCGTCGCAGCAACGTCTGCA 4680
3s              TCCTGCAGGAGCTCAACGTGACGGTGGTGACGTCCCTCTGCCGTCGCAGCAACGTCTGCA 276
                ************************************************************

ref             CTCTCGTGAGGGGCCGGCAGGCCGGCGTCTGTTTCGTACGTGCCCTGGGTGTCCCTCTGC 4740
3s              CTCTCGTGAGGGGCCGGCAGGCCGGCGTCTGTTTCGTACGTGCCCTGGGTGTCCCTCTGC 336
                ************************************************************

ref             TCCCCACCCGCTCCCAGCCCGGTACTGCAGCAACAGGCACCGTGGCTAGACCCTAGGATG 4800
3s              TCCCCACCCGCTCCCAGCCCGG-ACTGCAGCAACAGGCACCGTGGCTAGACCCTAGGA-G 394
                **********************_***********************************_*

ref             GGACTTCCCAACCCTGACACGTCGGCGGGCAGGTGGGCAGGGCCTCGCAGTCCAGCTTCC 4860
3s              GGACTTCCCAACCCTGACA-GGCGGCGGGCAGGTGGGCAGGGCCTCGCAGTCCAGCTTCC 453
                *******************_*_***************************************

ref             CCACCTTGTCTGCCTCCACAGGGGGACTCCGGCAGCCCCTTGGTCTGCAACGGGCTAATC 4920
3s              CCACCTTGTCTGCCTCCACAGGGGGACTCCGGCAGCCCCTTGGTCTGCAACGGGCTAATC 513
                ************************************************************

ref             CACGGAATTGCCTCCTTCGTCCGGGGAGGCTGCGCCTCAGGGCTCTACCCCGATGCCTTT 4980
3s              CACGGAATTGCCTCCTTCGTCCGGGGAGGCTGCGCCTCAGGGCTCTACCCCGATGCCTTT 573
                ************************************************************

ref             GCCCCGGTGGCACAGTTTGTAAACTGGATCGACTCTATCATCCAACGCTCCGAGGACAAC 5040
3s              GCCCCGGTGGCACAGTTTGTAAACTGGATCGACTCTATCATCCAACGCTCCGAGGACAAC 633
                ************************************************************

ref             CCCTGTCCCCACCCCCGGGACCCGGACCCGGCCAGCAGGACCCACTGAGAAGGGCTGCCC 5100
3s              CCCTGTCCCCACCCCCGGGACCCGGACCCGGCCAGCAGGACCCACTGAGAAGGGCTGCCC 693
                ************************************************************

ref             GGGTCACCTCAGCTGCCCACACCCACACTCTCCAGCATCTGGCACAATAAACATTCTCTG 5160
3s              GGGTCACCTCAGCTGCCCACACCCACACTCTC----------------------------- 725
                *******************************

ref             TTTTGTAGAATGTGTTTGATGCTCCTTGGCTGTGTGATTGGGTGTTGAAAATGGTCAGTA 5220
3s              ------------------------------------------------------------
```

Figure 3 : Alignement de séquences nucléotidiques correspondant à la partie 3 utilisée pour l'amplification du gène ELA2. Ref : référence ; 3s : patient SS infectieux. La séquence de l'exon 4 est en surbrillance en violet et celle de l'exon 5 en surbrillance rouge. * : alignement parfait. Les mutations sont soulignées en rouge.

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40, acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):

Donor site predictions for ref :

Start	End	Score	Exon Intron
29	43	0.52	actgaccgtgagcct
45	59	0.80	ggtgaaagtgagttc
270	284	0.87	ttgcgcagtgagtgc
612	626	0.98	acgctcggtaaatct
629	643	1.00	atttcgggtaagtat
782	796	0.85	ctgggaggtgaggca
805	819	0.64	acccgaggtcagctg
889	903	0.44	gaggcaggtgcctgt
1347	1361	0.92	ctgggggtgagttt
1585	1599	0.61	agtccaggtctgtct
1767	1781	0.89	gcacccggtgtgtcc
1936	1950	0.89	cgaatgtgtgagtag
1991	2005	0.69	ctgtgaggtgggtgg
2308	2322	0.50	tctccaggtgccgcc
3147	3161	0.73	tcacgaggtcaggtg
3522	3536	0.76	accacaggtgccacc
3860	3874	0.40	ctcccaggttcaagc
3892	3906	0.40	ctcccaggtagctgg
4709	4723	0.65	ctgtttcgtacgtgc
4826	4840	0.48	cgggcaggtgggcag
5207	5221	0.85	gaaaatggtcagtag

Figure 4 : Prédiction des différents sites donneur d'épissage au niveau du gène ELA2.

Acceptor site predictions for ref :

Start	End	Score	Intron Exon
295	335	0.65	tgcatgtggccggtatcacaggccctgggtaaactgaggc
348	388	0.65	tgcatgtggccggtatcacaggccctgggtaaactgaggc
401	441	0.65	tgcatgtggccggtatcacaggccctgggtaaactgaggc
454	494	0.65	tgcatgtggccggtatcacaggccctgggtaaactgaggc
557	597	0.91	cacccccatcaagtccctcaggtctaggtttggccaggttt
1146	1186	0.41	tttcatcaacgcctgtgccagggagaggaagtggagggcg
1206	1246	0.68	tgcaacggcctcccagcacaggctataagaggagccgggc
1399	1439	0.97	tctgttcccacctctccatagagggccccaccagtgtgggt
1434	1474	0.93	gtgggtccctcatcctcacagggaggtgccagctgggaca
1630	1670	0.64	ctttgcctctccgtgcctcagtttcctcatctgaacaacag
1765	1805	0.91	ccgcacccggtgtgtccccaggcaccgcgctggcctcggag
1842	1882	0.50	cccttcatggtgtccctgcagctgcgcggaggccacttctg
2065	2105	0.93	ctcgagcaccttcgccctcaggcccgtcgccggatggggac
2152	2192	0.95	cgcctctccctcttttggcagaaacgtccgcgcggtgcggg
2294	2334	0.82	aacgacatcgtgattctccaggtgccgccgggcgggcgggg
3407	3447	0.96	tgtcactaagttttctcatagctctcacccagtgcagtggc
3799	3839	0.58	aagtctcgctctgtcgcccaggctggagcgcagtgcacaat
3846	3886	0.91	cactgcacctccgcctcccaggttcaagcgattctcctgcc
3870	3910	0.59	caagcgattctcctgcctcagcctcccaggtagctgggact
3878	3918	0.90	tctcctgcctcagcctcccaggtagctgggactacaggcgc
3937	3977	0.42	aatttttggtattgttagtagagacggggtttaaccatgtt
4072	4112	0.99	tttttttattattttttgtagacatggggctttgccacatt
4294	4334	0.62	gtgacggctcccactctacagatggggaaaccgaggcttgc
4354	4394	0.82	ggtgggtatcctgccctgcaggatcccagaaccacagtgga
4464	4504	0.50	gatctgtccccaccgccacagctcaacgggtcggccaccat
4649	4689	0.54	gacgtccctctgccgtcgcagcaacgtctgcactctcgtga
4737	4777	0.51	ctgctccccacccgctcccagcccggtactgcagcaacagg

Figure 5 : Prédiction des différents sites accepteur d'épissage au niveau du gène ELA2.

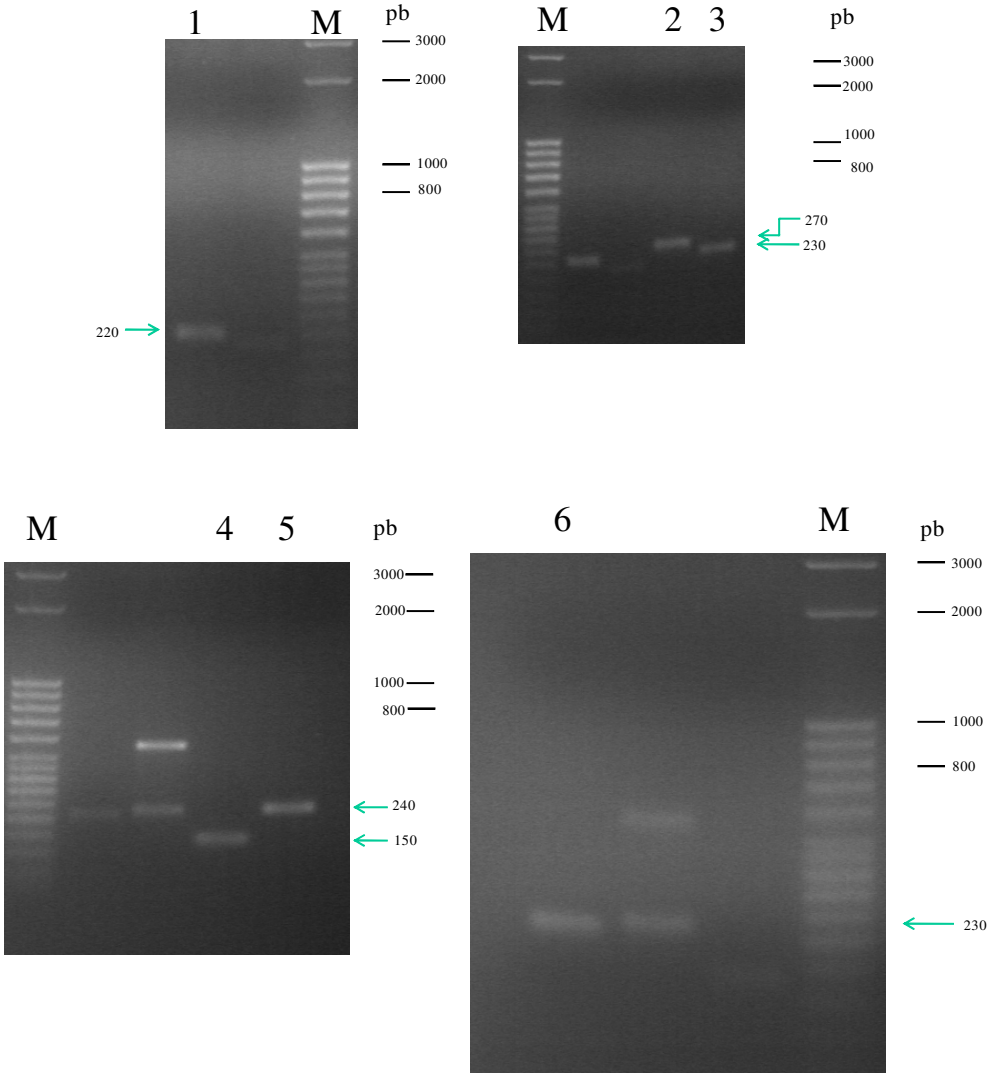

Figure 6 : Migration des produits de PCR des exons 2, 4, 5,10, 12 et 15 du gène codant la Lf.

Puits : M, Marqueur ; 1, Amplification de l'exon 2 ; 2, Amplification de l'exon 4. ; 3, Amplification de l'exon 5 ; 4, Amplification de l'exon 10 ; 5, Amplification de l'exon 12 ; 6, Amplification de l'exon 15.

Les flèches indiquent les produits de PCR obtenus ainsi que leur taille en pb.

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

18e2s           ------------------------------------------------------------
19e2s           ------------------------------------------------------------
ref             AGAGCCTTCGTTTGCCAAGTCGCCTCCAGACCGCAGACATGAAACTTGTCTTCCTCGTCC 60

18e2s           ------------CNCTCTCNGGACTGTGTCTGGCTGGCCGTAGGAGAAGGAGTGTTCAGT 48
19e2s           ---------------------GACTGTGTCTGGCTGGCCGTAGGAGAAGGAGTGTTCAGT 39
ref             TGCTGTTCCTCGGGGCCCTCGGACTGTGTCTGGCTGGCCGTAGGA---GGAGTGTTCAGT 117
                                      ************************   ************

18e2s           GGTGCACCGTATCCCAACCCGAGGCCACAAAATGCTTCCAATGGCAAAGGAATATGAGAA 108
19e2s           GGTGCACCGTATCCCAACCCGAGGCCACAAAATGCTTCCAATGGCAAAGGAATATGAGAA 99
ref             GGTGCGCCGTATCCCAACCCGAGGCCACAAAATGCTTCCAATGGCAAAGGAATATGAGAA 177
                ***** ****************************************************

18e2s           GAGTGCGTGGCCCTCCTGTCAGCTGCATAAAGAGAGACTCCCCCATCCAGTGTATCCAGG 168
19e2s           GAGTGCGTGGCCCTCCTGTCAGCTGCATAAAGAGAGACTCCCCCATCCAGTGTATCCAGG 159
ref             AAGTGCGTGGCCCTCCTGTCAGCTGCATAAAGAGAGACTCCCCCATCCAGTGTATCCAGG 237
                ************************************************************

18e2s           CCATTGCGGTGA-----GTCAATGCCG-GGTGTTGGTTGGGACCAAGCTGAATGGAA--- 219
19e2s           CCATTGCGGTGA-----GTCAATGCCG-GGTGTTGGTTGGGACCAAGCTGAATGGAA--- 210
ref             CCATTGCGGAAAACAGGGCCGATGCTGTGACCCTTGATGGTGGTTTCATATACGAGGCAG 297
                ********  *     * * **** * *    * * ***        *  * *

18e2s           ------------------------------------------------------------
19e2s           ------------------------------------------------------------
ref             GCCTGGCCCCCTACAAACTGCGACCTGTAGCGGCGGAAGTCTACGGGACCGAAAGACAGC 357
```

Figure 7 : Alignement de séquences nucléotidiques correspondant à l'exon 2 du gène codant la Lf.

Ref : séquence de référence ; 18e2s : patient SS infectieux ; 19e2s : individu témoin.

La séquence de l'exon 2 est en surbrillance en vert. * : alignement parfait. Les insertions de nucléotides sont soulignées en rouge.

```
ref             CTGTCTTGCAGAACACTGATGGAAATAACAATGAGGCATGGGCTAAGGATTTGAAGCTGG 1800
23e15s          ---------------------------ACA-TGAGGCATGGGCTAAGGATTTGAAGCTGG 32
                                             *** ****************************

ref             CAGACTTTGCGCTGCTGTGCCTCGATGGCAAACGGAAGCCTGTGACTGAGGCTAGAAGCT 1860
23e15s          CAGACTTTGCGCTGCTGTGCCTCGATGGCAAACGGAAGCCTGTGACTGAGGCTAGAAGCT 92
                ************************************************************

ref             GCCATCTTGCCATGGCCCCGAATCATGCCGTGGTGTCTCGGATGGATAAGGTGGAACGCC 1920
23e15s          GCCATCTTGCCATGGCCCCGAATCATGCCGTGGTGTCTCGGATGGATAAGGTGGAACGCC 152
                ************************************************************

ref             TGAAACAGGTGTTGCTCCACCAACAGGCTAAATTTGGGAGAAATGGATCTGACTGCCCGG 1980
23e15s          TGAAACAGGTGCTGCTCCACCAACAGG-----TATGGACCACAGGGCTTCTAGTGCTTTC 207
                *********** ***************     * ***   * * ** *   * ***

ref             ACAAGTTTTGCTTATTCCAGTCTGAAACCAAAAACCTTCTGTTCAATGACAACACTGAGT 2040
23e15s          TTA-GCTGTGTGGGCA------------------------------------------- 222
                  * * * **
```

Figure 8 : Alignement de séquences nucléotidiques correspondant à l'exon 15 du gène codant la Lf.

Ref : séquence de référence ; 23e15s : patient SS infectieux.

La séquence de l'exon 15 est en surbrillance en bleu.

* : alignement parfait. Les mutations sont soulignées en rouge.

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

ref             MKLVFLVLLFLGALGLCLAGRRR-SVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRD 59
ech19           MKLVFLVLLFLGALGLCLAGRRRRSVQWCTVSQPEATKCFQWQRNMRRVRGPPVSCIKRD 60
                ********************** *****:*****************:************

ref             SPIQCIQAIAENRADAVTLDGGFIYEAGLAPYKLRPVAAEVYGTERQPRTHYYAVAVVKK 119
ech19           SPIQCIQAIAENRADAVTLDGGFIYEAGLAPYKLRPVAAEVYGTERQPRTHYYAVAVVKK 120
                ************************************************************

ref             GGSFQLNELQGLKSCHTGLRRTAGWNVPIGTLRPFLNWTGPPEPIEAAVARFFSASCVPG 179
ech19           GGSFQLNELQGLKSCHTGLRRTAGWNVPIGTLRPFLNWTGPPEPIEAAVARFFSASCVPG 180
                ************************************************************

ref             ADKGQFPNLCRLCAGTGENKCAFSSQEPYFSYSGAFKCLRDGAGDVAFIRESTVFEDLSD 239
ech19           ADKGQFPNLCRLCAGTGENKCAFSSQEPYFSYSGAFKCLRDGAGDVAFIRESTVFEDLSD 240
                ************************************************************

ref             EAERDEYELLCPDNTRKPVDKFKDCHLARVPSHAVVARSVNGKEDAIWNLLRQAQEKFGK 299
ech19           EAERDEYELLCPDNTRKPVDKFKDCHLARVPSHAVVARSVNGKEDAIWNLLRQAQEKFGK 300
                ************************************************************

ref             DKSPKFQLFGSPSGQKDLLFKDSAIGFSRVPPRIDSGLYLGSGYFTAIQNLRKSEEEVAA 359
ech19           DKSPKFQLFGSPSGQKDLLFKDSAIGFSRVPPRIDSGLYLGSGYFTAIQNLRKSEEEVAA 360
                ************************************************************

ref             RRARVVWCAVGEQELRKCNQWSGLSEGSVTCSSASTTEDCIALVLKGEADAMSLDGGYVY 419
ech19           RRARVVWCAVGEQELRKCNQWSGLSEGSVTCSSASTTEDCIALVLKGEADAMSLDGGYVY 420
                ************************************************************

ref             TAGKCGLVPVLAENYKSQQSSDPDPNCVDRPVEGYLAVAVVRRSDTSLTWNSVKGKKSCH 479
ech19           TAGKCGLVPVLAENYKSQQSSDPDPNCVDRPVEGYLAVAVVRRSDTSLTWNSVKGKKSCH 480
                ************************************************************

ref             TAVDRTAGWNIPMGLLFNQTGSCKFDEYFSQSCAPGSDPRSNLCALCIGDEQGENKCVPN 539
ech19           TAVDRTAGWNIPMGLLFNQTGSCKFDEYFSQSCAPGSDPRSNLCALCIGDEQGENKCVPN 540
                ************************************************************

ref             SNERYYGYTGAFRCLAENAGDVAFVKDVTVLQNTDGNNNEAWAKDLKLADFALLCLDGKR 599
ech19           SNERYYGYTGAFRCLAENAGDVAFVKDVTVLQNTDGNNNEAWAKDLKLADFALLCLDGKR 600
                ************************************************************

ref             KPVTEARSCHLAMAPNHAVVSRMDKVERLKQVLLHQQAKFGRNGSDCPDKFCLFQSETKN 659
ech19           KPVTEARSCHLAMAPNHAVVSRMDKVERLKQVLLHQQAKFGRNGSDCPDKFCLFQSETKN 660
                ************************************************************

ref             LLFNDNTECLARLHGKTTYEKYLGPQYVAGITNLKKCSTSPLLEACEFLRK 710
ech19           LLFNDNTECLARLHGKTTYEKYLGPQYVAGITNLKKCSTSPLLEACEFLRK 711
                **************************************************
```

Figure 9 : Alignement de séquences protéique de la Lf chez l'individu normal.

Ref : séquence de référence ; ech19 : témoin sain.

* : alignement parfait. Les mutations sont soulignées en rouge.

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment


ref             MKLVFLVLLFLGALGLCLAGRRR-SVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRD 59
ech9912         MKLVFLVLLFLGALGLCLAGRRRRSVQWCTVSQPEATKCFQWQRNMRRVRGPPVSCIKRD 60
                ***********************_*****:*****************:************

ref             SPIQCIQAIAENRADAVTLDGGFIYEAGLAPYKLRPVAAEVYGTERQPRTHYYAVAVVKK 119
ech9912         SPIQCIQAIAENRADAVTLDGGFIYEAGLAPYKLRPVAAEVYGTERQPRTHYYAVAVVKK 120
                ************************************************************

ref             GGSFQLNELQGLKSCHTGLRRTAGWNVPIGTLRPFLNWTGPPEPIEAAVARFFSASCVPG 179
ech9912         GGSFQLNELQGLKSCHTGLRRTAGWNVPIGTLRPFLNWTGPPEPIEAAVARFFSASCVPG 180
                ************************************************************

ref             ADKGQFPNLCRLCAGTGENKCAFSSQEPYFSYSGAFKCLRDGAGDVAFIRESTVFEDLSD 239
ech9912         ADKGQFPNLCRLCAGTGENKCAFSSQEPYFSYSGAFKCLRDGAGDVAFIRESTVFEDLSD 240
                ************************************************************

ref             EAERDEYELLCPDNTRKPVDKFKDCHLARVPSHAVVARSVNGKEDAIWNLLRQAQEKFGK 299
ech9912         EAERDEYELLCPDNTRKPVDKFKDCHLARVPSHAVVARSVNGKEDAIWNLLRQAQEKFGK 300
                ************************************************************

ref             DKSPKFQLFGSPSGQKDLLFKDSAIGFSRVPPRIDSGLYLGSGYFTAIQNLRKSEEEVAA 359
ech9912         DKSPKFQLFGSPSGQKDLLFKDSAIGFSRVPPRIDSGLYLGSGYFTAIQNLRKSEEEVAA 360
                ************************************************************

ref             RRARVVWCAVGEQELRKCNQWSGLSEGSVTCSSASTTEDCIALVLKGEADAMSLDGGYVY 419
ech9912         RRARVVWCAVGEQELRKCNQWSGLSEGSVTCSSASTTEDCIALVLKGEADAMSLDGGYVY 420
                ************************************************************

ref             TAGKCGLVPVLAENYKSQQSSDPDPNCVDRPVEGYLAVAVVRRSDTSLTWNSVKGKKSCH 479
ech9912         TAGKCGLVPVLAENYKSQQSSDPDPNCVDRPVEGYLAVAVVRRSDTSLTWNSVKGKKSCH 480
                ************************************************************

ref             TAVDRTAGWNIPMGLLFNQTGSCKFDEYFSQSCAPGSDPRSNLCALCIGDEQGENKCVPN 539
ech9912         TAVDRTAGWNIPMGLLFNQTGSCKFDEYFSQSCAPGSDPRSNLCALCIGDEQGENKCVPN 540
                ************************************************************

ref             SNERYYGYTGAFRCLAENAGDVAFVKDVTVLQNTDGNNNEAWAKDLKLADFALLCLDGKR 599
ech9912         SNERYYGYTGAFRCLAENAGDVAFVKDVTVLQNTDGNN---MRHGLRI------------ 585
                ************************************_____:.*::

ref             KPVTEARSCHLAMAPNHAVVSRMDKVERLKQVLLHQQAKFGRNGSDCPDKFCLFQSETKN 659
ech9912         ------------------------------------------------------------


ref             LLFNDNTECLARLHGKTTYEKYLGPQYVAGITNLKKCSTSPLLEACEFLRK 710
ech9912         ---------------------------------------------------
```

Figure 10 : Alignement de séquences protéique de la Lf chez le patient SS infectieux.

Ref : séquence de référence ; ech9912 : patient SS infectieux.

* : alignement parfait. Les mutations sont soulignées en rouge.