

Maladies congénitales du squelette de la membrane érythrocytaire

La connaissance de la structure des protéines du squelette de la membrane érythrocytaire a permis de définir les supports moléculaires de certaines maladies congénitales du globule rouge et d'en démontrer l'hétérogénéité. Les anomalies les mieux individualisées intéressent la spectrine et la protéine 4.1, dont les méthodes d'étude ont été bien définies.

Pierre Boivin

Directeur de l'unité Inserm U 160, chef du service d'hématologie de l'hôpital Beaujon.

RÉFÉRENCES

1. Cohen CM. The molecular organization of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol* 1983; 20 : 141-58.
2. Marchesi VT. The red cell membrane skeleton: recent progress. *Blood* 1983; 61 : 1-11.
3. Boivin P. Interactions moléculaires des protéines de la membrane et déformabilité érythrocytaire. *Pathol Biol* 1984; 32 : 717-35.
4. Laemmli UK. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 : 680-5.
5. Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli UK. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1977; 252 : 1102-6.
6. Speicher OW, Morrow JS, Knowles WJ, Marchesi VT. Identification of proteolytically resistant domains of human erythrocyte spectrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77 : 5673-7.
7. Morrow JS, Speicher DW, Knowles WJ, Hsu J, Marchesi V. Identification of functional domains of human erythrocyte spectrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77 : 6592-6.

ADRESSE

P. Boivin, Inserm U160, Hôpital Beaujon, 92118 Clichy Cedex.

Comme les autres membranes cellulaires, celle du globule rouge est formée d'une double couche de phospholipides opposés par leurs groupements hydrophobes et stabilisés par du cholestérol libre, et de protéines parmi lesquelles on distingue des protéines dites intégrales ou transmembranaires parce qu'elles traversent de part en part la double couche de lipides et des protéines dites extrinsèques parce qu'elles sont en dehors de celle-ci vers l'intérieur ou l'extérieur du globule rouge [1]. Celles situées à la face interne de la membrane constituent essentiellement le squelette membranaire. Celui-ci est un filet, un grillage qui tapisse toute la surface interne de la bicouche lipidique en mailles irrégulières bien objectivées par la microscopie à haute résolution. Trois protéines essentielles entrent dans la constitution de ce squelette : la spectrine, l'actine et la protéine 4.1.

La spectrine est une protéine allongée dont la molécule de base est un hétérodimère formé d'une chaîne α de MR 240 000 et d'une chaîne β un peu plus légère de MR 220 000. Les deux chaînes enroulées l'une sur l'autre forment des fibres flexibles et déformables d'environ 100 nanomètres de long. Deux dimères s'attachent l'un à l'autre par leur extrémité proximale, dite tête, pour former des tétramères et des oligo-

mères de plus haut degré [2] qui constituent les formes normales de la spectrine in vivo. Les deux chaînes α et β sont impliquées dans la tétramérisation. Cette interaction entre deux molécules de dimère est une propriété fondamentale de la spectrine. Par leur extrémité distale, des tétramères s'attachent les uns aux autres pour former les « nœuds » des mailles du filet; cette liaison se fait par l'intermédiaire de l'actine, forme particulière paucipolymérisée de β actine; l'interaction entre spectrine et actine est considérablement facilitée par la présence de la protéine 4.1 elle-même formée de deux composants 4.1a et 4.1b de masse moléculaire respective 82 000 et 78 000. Le squelette membranaire est attaché au reste de la membrane par une protéine d'ancrage, l'ankyrine qui se lie d'une part à la chaîne β de la spectrine, d'autre part au segment cytoplasmique de la principale protéine transmembranaire nommée protéine 3. D'autres ancrages semblent se faire par l'intermédiaire d'une interaction entre la protéine 4.1 et une des glycoprotéines membranaires, la glycophorine C, glycoconnectine ou glycoprotéine β et par des interactions moléculaires entre les protéines du squelette et les lipides membranaires [3]. Nous ne traiterons ici que des anomalies moléculaires des protéines membranaires qui semblent primiti-

ves, à l'exclusion de celles liées à la présence d'un déficit enzymatique cytosolique ou d'une hémoglobine pathologique.

■ Méthodes d'étude ■

La mise en évidence et l'identification d'une anomalie moléculaire ou d'une interaction anormale entre les protéines du squelette membranaire nécessite la mise en œuvre de multiples épreuves de laboratoire. Celles-ci doivent être pratiquées sur les prélèvements sanguins frais afin d'éviter les artéfacts.

L'aspect morphologique des globules rouges peut être apprécié sur les frottis sanguins mais l'examen à l'état frais d'une suspension de globules rouges fixés à la glutaraldehyde rend mieux compte de la forme des érythrocytes et du pourcentage des formes anormales. L'étude de la déformabilité au moyen de l'ektacytomètre, en faisant varier l'osmolalité, permet de définir une courbe de l'indice ektacytométrique caractéristique des divers types d'anomalies membranaires congénitales. Une telle épreuve est particulièrement utile dans les études génétiques.

La sensibilité thermique des érythrocytes est étudiée en incubant des globules rouges pendant 10 à 60 minutes à des températures variant de 43 à 49°C. Les GR incubés sont examinés au microscope à la recherche de bourgeonnements et de fragmentations membranaires et/ou à l'ektacytomètre.

L'analyse globale des protéines membranaires après dissolution des ghosts dans le SDS est faite par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS. La technique de Laemmli [4] permet une excellente séparation des protéines en particulier des 4.1 *a* et 4.1 *b*. Les gels sont colorés au bleu de Coomassie pour l'identification des peptides, à l'acide périodique-Schiff ou à l'argent pour la mise en évidence des glycoprotéines. Lorsqu'un constituant protéique de mobilité anormale est mis en évidence par l'électrophorèse, il peut être difficile de savoir quel constituant normal il

remplace ou de quel peptide il provient. Les méthodes immunologiques sont ici nécessaires : la technique de l'immunoblot avec les immun-sérums mono ou polyclonaux spécifiques permet l'identification du constituant anormal.

L'étude fonctionnelle des interactions entre molécules protéiques est un temps fondamental de l'identification des lésions membranaires.

(a) Interactions entre dimères de spectrine. L'interaction entre dimères in vivo est reflétée par l'état de la spectrine extraite à faible force ionique et 4°C : 85 % au moins de la spectrine sont sous forme de tétramères, 15 % au plus sous forme dimérique. L'extraction à 37°C à faible force ionique fournit essentiellement des dimères de spectrine. Incubés à 30°C en conditions isotoniques les dimères se transforment en tétramères jusqu'à atteindre un point d'équilibre thermodynamique; la pratique de cette transformation in vitro permet de définir une constante d'association dimère-dimère qui pour la spectrine normale est dans notre laboratoire de $6(\pm 0,4) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Dans toutes ces épreuves les quantités respectives de dimères et de tétramères peuvent être appréciées après séparation des deux espèces soit par gel filtration soit par sédimentation en gradient de sucrose, soit par électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant.

(b) Étude fonctionnelle de la protéine 4.1. En présence de protéine 4.1, une forte interaction entre spectrine et actine apparaît, aboutissant à la formation d'un complexe ternaire stable actine-protéine 4.1-spectrine. Cette propriété de la protéine 4.1 peut être étudiée in vitro en observant l'incorporation de spectrine dimérique dans des complexes protéiques de haut poids moléculaire composés de spectrine et d'actine. Ainsi, il faut ajouter 155 µg de protéine 4.1 à 1 mg de spectrine brute pour observer une disparition de 50 % du dimère de spectrine présent dans cette extraction. Les études les plus fines et les plus riches en enseignement ont été menées en utilisant de la protéine 4.1 marquée à l'¹²⁵I et de la

spectrine elle aussi marquée à l'¹²⁵I ou par phosphorylation. La mise en contact de quantités variables de ces protéines et la séparation du complexe formé soit par gradient de sédimentation soit par méthodes immunologiques permet de déterminer les quantités respectives de protéines qui fixent l'une et l'autre. Une autre technique très élégante utilise une colonne d'affinité de sepharose-protéine 4.1 sur laquelle on fait passer de la spectrine purifiée; l'éluion étant faite par un gradient de force ionique. Un défaut de fixation à une protéine 4.1 normale évoque l'existence d'une anomalie moléculaire de la chaîne β de la spectrine.

(c) L'interaction entre spectrine et ankyrine est étudiée par la fixation de spectrine purifiée marquée par un radio-isotope soit ¹²⁵I soit ³²P sur des vésicules retournées déplétées en spectrine-actine. On peut ainsi calculer au moyen du diagramme de Schatchard le nombre de sites de fixation et leur affinité. Cette méthode de même que celle d'étude de l'interaction ankyrine-bande 3 est de réalisation difficile et de résultats souvent incertains.

Études structurales : Une digestion protéolytique limitée peut être pratiquée soit sur les chaînes α et β isolées soit sur les dimères ou tétramères de spectrine. La méthode de Cleveland [5] permet d'étudier les chaînes α et β isolées à partir de très faibles quantités de protéines membranaires. Cependant, la méthode de Speicher *et al.* [6] de protéolyse de spectrine est plus généralement employée pour permettre les comparaisons des résultats d'un laboratoire à l'autre. Cette méthode a permis de définir des domaines relativement résistants à la protéolyse correspondant à des peptides volumineux que l'on peut séparer par électrophorèse en gel d'acrylamide en une ou en deux dimensions par combinaison d'électrophorèse et d'électrofocalisation : cinq domaines dénommés αI à αV pour la chaîne α, quatre pour la chaîne β (βI à βIV) [7]. Dans le cadre des malades héréditaires, les domaines jusqu'ici concernés sont surtout le peptide de 80 K ou domaine I de la chaîne

α (α I) et le peptide 28 K de la chaîne β (β I) porteur de l'extrémité COOH terminale et des sites de phosphorylation de cette chaîne.

Anomalies moléculaires de la spectrine

Elliptocytoses constitutionnelles avec anomalies de la chaîne α de la spectrine.

Les elliptocytoses dites de type I fréquentes chez les sujets de race noire sont rencontrées principalement à l'état hétérozygote chez l'adulte où elles ne s'accompagnent que d'une hémolyse modérée ou nulle. Chez les nouveaux-nés hétérozygotes elles sont parfois cause d'une hémolyse intense avec poikilocytose et schizocytose, hémolyse dont l'évolution est favorable au cours de la première année de la vie au bout de laquelle le tableau clinique et hématologique redevient progressivement celui de l'elliptocytose hétérozygote de l'adulte que porte l'un des parents. A l'état homozygote, le tableau est celui d'une hémolyse intense de l'enfant avec poikilocytose et pycnocytose. Les anomalies de la spectrine sont soupçonnées sur les données suivantes :

(a) lors des extractions à 4°C à faible force ionique, le pourcentage de dimères (normalement inférieur à 15%) est constamment augmenté, généralement entre 20 et plus de 50% [8, 9];
 (b) la constante d'association des dimères in vitro ($n = 6 \times 10^5 M^{-1} \pm 0,4$) est diminuée (de 1 à $3 \times 10^5 M^{-1}$);
 (c) l'épreuve de stabilité thermique montre un abaissement de la température de dénaturation inférieur aux 49°C normaux et qui peut atteindre 43 à 47°C surtout chez les homozygotes [9].

L'affirmation des anomalies est apportée par la digestion protéolytique ménagée et l'établissement des cartes peptidiques [10]. Dans les elliptocytoses de type I les anomalies jusqu'ici décrites atteignent le segment I de la chaîne α de la spectrine qui est représenté par un peptide de 8000 de poids moléculaire. Ce peptide est constamment diminué, d'environ 50% chez les hétérozygotes, de sa totalité chez les

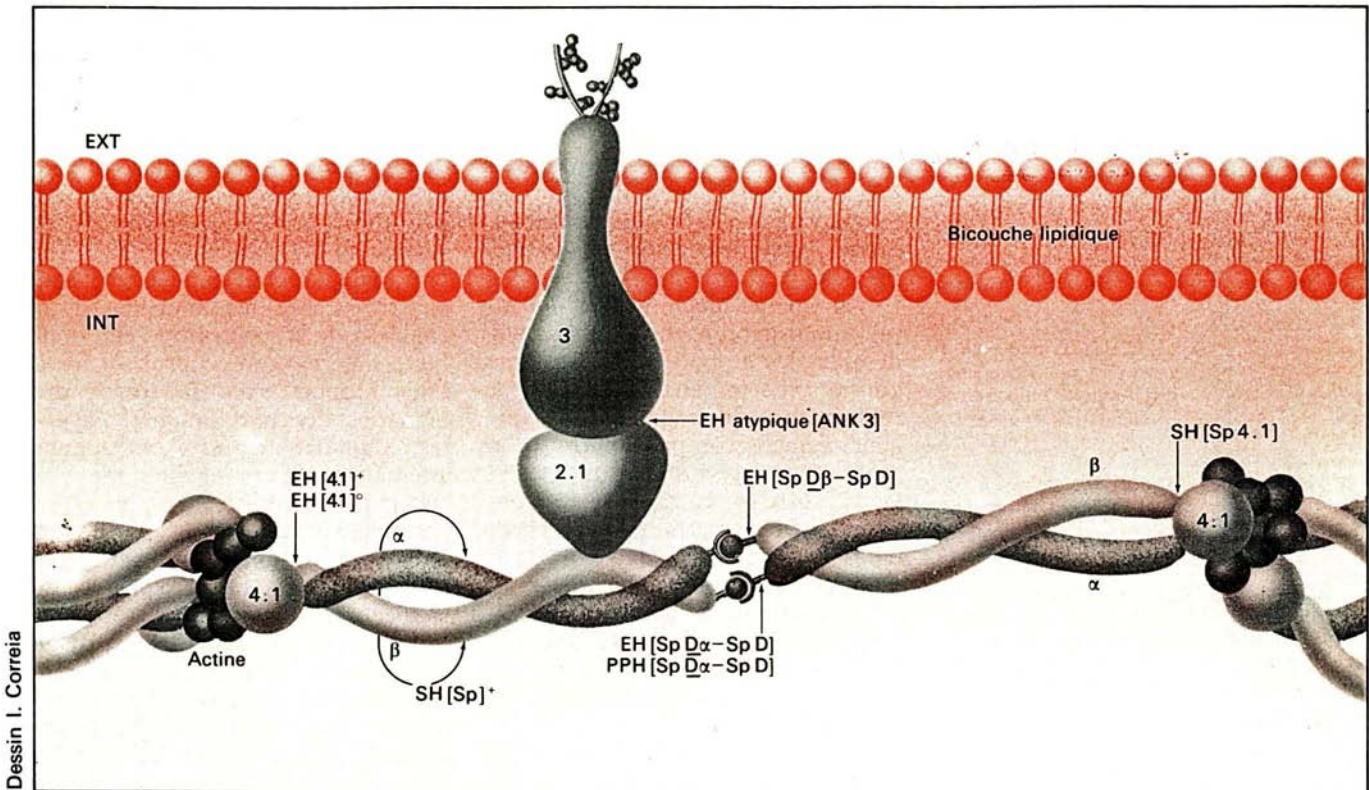
homozygotes. Des peptides anormaux apparaissent, de plus faibles poids moléculaires, qui répondent à trois variants jusqu'ici isolés : — un variant de 74 KD donnant lieu, selon la nomenclature actuelle, à un phénotype (Sp D $\alpha^{1/74}$) (SpD = spectrine dimère, α I répond au segment impliqué, 74 au PM du peptide). Le génotype hétérozygote est alors (Sp D $\alpha^{1/74}$) — (SpD) et (Sp D $\alpha^{1/74}$) — (Sp D $\alpha^{1/74}$) chez les homozygotes. — un variant de 46 KD (souvent accompagné d'un peptide de 22 KD) répondant aux phénotypes (Sp D $\alpha^{1/46}$) et aux génotypes respectifs (Sp D $\alpha^{1/46}$) — (SpD) et (Sp D $\alpha^{1/46}$) — (Sp D $\alpha^{1/46}$) chez les hétéro et homozygotes. — un variant de 65 KD, probablement le plus fréquent [11] avec le génotype (Sp D $\alpha^{1/65}$) et les phénotypes (Sp D $\alpha^{1/65}$) — (SpD) et (Sp D $\alpha^{1/65}$) — (Sp D $\alpha^{1/65}$). Les températures de dénaturation sont normales chez les hétérozygotes porteurs du peptide 74 KD. Elles sont modérément abaissées (47°C) chez les sujets hétérozygotes porteurs des peptides 46 et 65KD. Elles sont constamment et fortement abaissées chez les enfants hétérozygotes avec poikilocytose (autour de 45°C) et chez les homozygotes, quel que soit le variant (autour de 45°C). Que l'enzyme protéolytique coupe la molécule à des emplacements différents de la normale prouve, soit que les liaisons peptidiques coupées ont une position anormale par mutation structurale, soit que la conformation anormale de la molécule expose à l'action de l'enzyme des sites normalement masqués. Dans les deux hypothèses une anomalie moléculaire est présente. A côté de ces variants accompagnant une elliptocytose, d'autres variants ont été dépistés chez des sujets de race noire en l'absence de toute manifestation pathologique. Ils sont situés sur les domaines α_2 et α_3 de la chaîne α de la spectrine et constituent un simple polymorphisme génétique. Ils peuvent coexister avec les variants α_1 de l'elliptocytose [10, 12].

Elliptocytoses avec anomalies de la chaîne β de la spectrine

(a) Un premier type bien défini

RÉFÉRENCES

- Liu SC, Palek J, Prchal JT. Defective spectrin dimer-dimer association in hereditary elliptocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 2072-6.
- Palek J, Lux SE. Red cell membrane defect in hereditary and acquired hemolytic anemias. *Semin Hematol* 1983; 20 : 189-224.
- Knowles W, Marchesi SL, Marchesi VT. Spectrin: structure function and abnormalities. *Semin Hematol* 1983; 20 : 159-74.
- Lecomte MC, Dhermy D, Garbarz M, et al. Heterogeneity in the molecular defect of spectrin (Sp) in type I hereditary elliptocytosis (HE). Identification of a third variant within α -chain (Abst). *Blood* 1984; 64 Suppl. 1 : 28 a.
- Lecomte MC, Gautero H, Boivin P. Polymorphisme génétique de la chaîne α de la spectrine. *CR Acad Sci Paris* 1983; 296 Série III : 841-3.
- Dhermy D, Lecomte MC, Garbarz M, et al. Spectrin β -chain variant associated with hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest* 1982; 70 : 707-15.
- Coetzer T, Zail SS. Tryptic digestion of spectrin in variants of hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest* 1981; 67 : 1241-8.
- Zail SS, Coetzer TL. Defective binding of spectrin to ankyrin in a kindred with recessively inherited hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest* 1984; 74 : 753-62.
- Liu SC, Palek J, Prchal J, Castleberry RP. Altered spectrin dimer-dimer association and instability of erythrocyte membrane skeleton in hereditary pyropoikilocytosis. *J Clin Invest* 1981; 68 : 597-605.
- Knowles WJ, Morrow JS, Speicher DW, et al. Molecular and functional changes in spectrin from patients with hereditary pyropoikilocytosis. *J Clin Invest* 1983; 71 : 1867-77.



Dessin I. Correia

Représentation schématisique du cytosquelette avec la localisation des anomalies moléculaires connues au cours des elliptocytoses héréditaires (EH), de la pyropoïkilocytose héréditaire (PPH) et de la sphérocytose héréditaire (SH).

$EH [4.1]^+$: déficit partiel en protéine 4.1

$EH [4.1]^0$: déficit complet en protéine 4.1

$SH [Sp]^+$: déficit partiel en spectrine

$SH [Sp 4.1]$: défaut d'interaction de la spectrine avec la protéine 4.1 normale

$EH [ANK 3]$: défaut d'interaction entre l'ankyrine et la protéine bande 3 normale in situ.

$EH [Sp-D\beta-SpD]$: défaut d'autoassociation en dimère de spectrine ; le dimère pathologique est modifié sur sa chaîne β

EH et $PPH [Sp-D\alpha-SpD]$: défaut d'autoassociation des dimères de spectrine ; le dimère pathologique est modifié sur sa chaîne α

répond à une observation unique mais fondamentale dans la mesure où elle comporte la première démonstration formelle d'une anomalie structurale de la molécule de spectrine [13]. Elle concerne une femme et son père, porteurs d'une hémolyse modérée, et d'une elliptocytose avec poïkilocytose. La caractéristique biochimique est l'existence chez les deux sujets d'une chaîne β de la spectrine anormale, transmise à l'état hétérozygote et représentant 50% des chaînes β totales. L'anomalie structurale consiste en un raccourcissement de la chaîne β par absence d'un peptide de 6 000 environ de masse moléculaire; l'absence totale de phosphorylation de la chaîne mutée localise sur ce peptide les sites normaux de

phosphorylation de la spectrine; le dimère formé de la chaîne α normale et de la chaîne β mutée est totalement incapable de se lier à un autre dimère pour former un tétramère apportant la preuve de la nécessité de l'intégrité du segment capital de la chaîne β dans le processus de tétramérisation. Bien que non démontré, le mécanisme génétique pourrait être une délétion d'un segment important d'un gène de structure de la chaîne β .

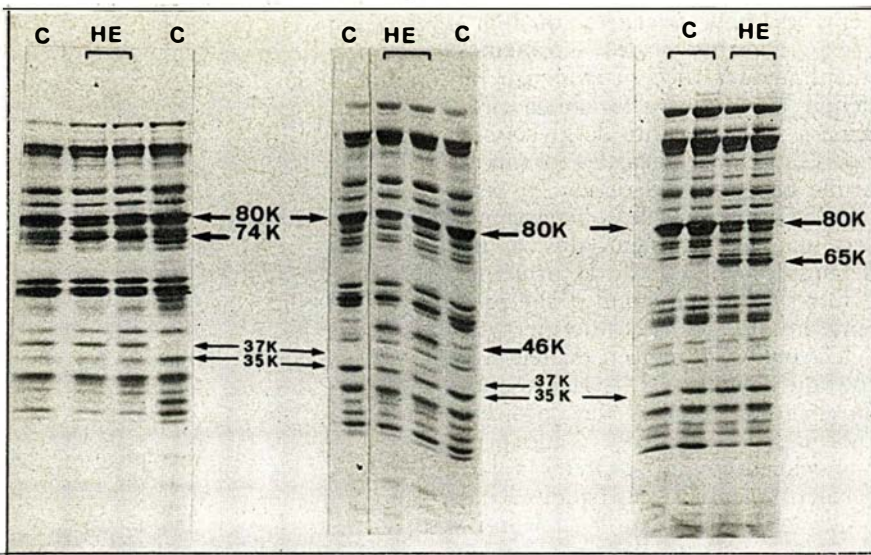
(b) Une autre variété d'anomalies de la chaîne β est suspectée sur les données de la protéolyse ménagée de la spectrine [14]. Les perturbations n'intéressent pas la chaîne α , les deux chaînes de spectrine ont un aspect électrophorétique normal mais il existe un trouble de l'équili-

bre dimère-tétramère avec un excès de dimère dans les extractions à 4°C et une diminution de la tétramérisation in vitro [15]. L'anomalie moléculaire correspondante n'est pas identifiée; elle semble intéresser l'extrémité céphalique de la chaîne β mais diffère certainement de celle décrite dans le chapitre précédent.

Pyropoïkilocytose héréditaire et anomalies de la chaîne α de la spectrine : il s'agit là d'une maladie hémolytique rare observée essentiellement dans les populations noires. Elle est caractérisée chez les propositus par une hémolyse néonatale de la petite enfance, de haute gravité, nécessitant des transfusions sanguines répétées à court intervalle et obligeant fréquemment à prati-

RÉFÉRENCES

18. Lawler J, Liu SC, Palek J, Prchal J. Molecular defect of spectrin in hereditary pyropoikilocytosis. Alterations in the trypsin-resistant domain involved in spectrin self-association. *J. Clin Invest* 1982; 70 : 1019-30.
19. Lawler J, Palek J, Prchal J, Butler WM. Molecular heterogeneity of hereditary pyropoikilocytosis: identification of a second variant of the spectrin α -subunit. *Blood* 1983; 62 : 1182-9.
20. Greenquist A, Shohet SB, Bernstein SE. Marked reduction of spectrin in hereditary spherocytosis in the common house mouse. *Blood* 1978; 51 : 1149-55.
21. Goodman SR, Shiffer KA, Casoria LA, Eyster ME. Identification of the molecular defect in the erythrocyte membrane skeleton of some kindreds with hereditary spherocytosis. *Blood* 1982; 60 : 772-84.
22. Wolfe LC, John KM, Falcone JC, Byrne AM, Lux S. A genetic defect in the binding of protein 4.1 to spectrin in a kindred with hereditary spherocytosis. *N Engl J Med* 1982; 307 : 1367-73.
23. Becker PS, Cohen CM, Lux SE. Mild oxidation alters the structure of human erythrocyte spectrin (Abst). *Blood* 1984; 64 Suppl. 1 : 23a.
24. Agre P, Orringer EP, Bennett V. Deficient red-cell spectrin in severe recessively inherited spherocytosis. *N Engl J Med* 1982; 306 : 1155-61.
25. Féo CS, Fisher S, Piau JP, Grange MJ, Tchernia G. Première observation de l'absence d'une protéine de la membrane érythrocytaire (bande 4.1) dans un cas d'anémie elliptocytaire familiale. *Nouv Rev Fr Hematol* 1980; 22 : 315-25.
26. Garbarz M, Dhermy D, Lecomte MC, et al. A variant of erythrocyte membrane skeletal protein band 4.1 associated with hereditary elliptocytosis. *Blood* 1985; 64 : 1006-15.
27. Alloisio N, Dorleac E, Delaunay J, Girot R, Galand C, Boivin P. A shortened variant of red cell membrane protein 4.1. *Blood* 1982; 60 : 265-7.
28. Smith JE, Moore K, Arens M, Rinderknecht GA, Ledet A. Hereditary elliptocytosis with protein band 4.1 deficiency in the dog. *Blood* 1983; 61 : 373-7.
29. Hill JS, Sawyer WH, Howlett GJ, Wiley JS. Hereditary spherocytosis in man. Altered binding of cytoskeletal components to the erythrocyte membrane. *Biochem J* 1981; 201 : 259-66.
30. Agre P, Orringer EP, Chui DHK, Bennett V. A molecular defect in two families with hemolytic poikilocytic anemia. Reduction of high affinity membrane binding sites for ankyrin. *J Clin Invest* 1981; 68 : 1566-76.
- quer une splénectomie précoce qui améliore constamment l'hémolyse. Sur le plan strictement hématologique, les caractéristiques des hématies sont une grande anisopoikilocytose avec de nombreuses fragmentations globulaires, de microcytes, des hématies bourgeonnantes, quelques ovalocytes et sphérocytes.
- Les anomalies biochimiques sont :
- (a) une instabilité thermique considérable des globules rouges et des ghosts avec un abaissement de la température de fragmentation qui, généralement comprise entre 45 et 47°C, peut descendre jusqu'à 43°C. Cette baisse est en rapport avec une dénaturation thermique anormale de la spectrine et fait partie de la définition même de la maladie;
- (b) l'extraction à 4°C fournit la spectrine essentiellement sous la forme dimérique qui représente jusqu'à soixante pour cent et plus de l'extrait total [16];
- (c) l'épreuve de tétramérisation in vitro est caricaturale : seule une faible part de dimère est apte à subir la transformation tétramérique et la constante d'association est effondrée à un chiffre voisin de : $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ($n \approx 6 \pm 0,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$);
- (d) l'analyse des cartes peptidiques met en évidence un état hétérozygote caractérisé par une diminution du peptide 80 KD remplacé plus ou moins par un peptide de Mr 74 KD, 65 KD ou 46 KD, anomalies analogues à celles observées dans l'elliptocytose constitutionnelle de type I hétérozygote [17, 18, 19].
- Les données sur la transmission héréditaire montrent que celle-ci est d'apparence récessive et que les malades sont probablement porteurs double-hétérozygotes d'une anomalie moléculaire érythrocytaire. Bien que le nombre d'observations connues soit faible et que le mécanisme de transmission génétique n'ait pas pu être toujours élucidé, il est clair que les deux parents sont souvent normaux cliniquement et selon les données classiques de l'hémogramme. Dans certains cas l'un des parents est porteur d'une elliptocytose constitutionnelle de type I, conforme à la description ci-dessus et dont la spectrine possède les caractères pathologiques décrits [9]. Même lorsqu'il en est ainsi chez le
- second géniteur qui apparaît normal, on peut parfois mettre en évidence les anomalies biochimiques de la spectrine : excès de dimère dans l'extraction à 4°C, défaut d'interaction dimère-dimère in vitro, diminution du fragment peptidique 80 KD et présence d'un variant 74 KD, 46 ou 65 KD. L'enfant malade paraît donc avoir hérité de ses parents des anomalies de la chaîne α de la spectrine à l'état double hétérozygote, probablement sans rapport avec la forme des hématies des porteurs hétérozygotes. Mais dans d'autres cas, aucune anomalie fonctionnelle de la spectrine n'est décelée chez les parents. Ce fait négatif peut avoir deux explications hypothétiques : soit que nos méthodes d'analyse de la spectrine soient encore trop sommaires pour permettre le dépistage d'anomalies présentes à l'état hétérozygote et « masquées » par la présence d'une part de spectrine normale, soit que le ou les troubles présents chez les parents intéressent des systèmes d'interactions non encore connus.
- Sphérocytose héréditaire** : si jusqu'ici aucune anomalie qualitative de protéines membranaires n'avait pu être décrite au cours des sphérocytoses héréditaires à transmission dominante, l'atteinte de la spectrine y était déjà pratiquement certaine sur les arguments suivants : l'instabilité à l'urée des squelettes des hématies de la sphérocytose héréditaire; l'impossibilité pour les extraits membranaires (spectrine brute) de stimuler la polymérisation d'actine-G ajoutée au milieu; l'impossibilité de former un gel en exposant les coquilles à la phosphorylation par la spectrine-kinase purifiée; l'insuffisance de phosphorylation du composant 2 de la spectrine, inconstante certes mais expliquée non par un déficit des activités protéine-kinasiques mais par un défaut de sites de phosphorylation; la formation expérimentale de sphérocytes par action de substances végétales telles la vinblastine et la colchicine qui dénaturent la spectrine.
- En outre un modèle animal de sphé-



Mise en évidence par électrophorèse unidimensionnelle des peptides de protéolyse ménagée répondant aux trois variants communs du peptide alpha-1 de la spectrine chez des sujets atteints d'elliptocytose héréditaire (HE).

Dans ce type d'expérience les peptides sont séparés selon leur taille, ceux de hauts poids moléculaires migrant plus lentement (haut du gel) que ceux de bas poids moléculaires (bas du gel)

K = milliers en unités de poids moléculaire (80 K = 80 000 daltons)

Par rapport aux témoins (C) on note la diminution du peptide 80 K et la présence de peptides 74 K, 46 K et 65 K. Les anomalies présentes au niveau des peptides 37-35 K sont dues au polymorphisme génétique du segment alpha-2.

rocytose héréditaire a été décrit chez la souris, caractérisé par une grande instabilité érythrocytaire, la présence de sphérocytes avec bourgeonnements et fragmentation érythrocytaire et par un déficit de spectrine. Plusieurs types en existent où la gravité de l'anémie hémolytique et l'intensité des lésions globulaires sont directement en rapport avec la gravité du déficit en spectrine : plus intense est celui-ci plus grave est l'hémolyse [20].

(a) Sphérocytose héréditaire de type I : chez l'homme, l'affirmation d'une anomalie moléculaire de la

spectrine comme responsable de certains cas de sphérocytose héréditaire a été récemment apportée par deux équipes américaines qui ont démontré l'existence d'un trouble des interactions entre la spectrine et la protéine 4.1 [21, 22]. L'anomalie a été trouvée chez environ un tiers des familles de sphérocytose héréditaire typique qui ont été étudiées. L'application des méthodes décrites ci-dessus a montré que tous les malades étaient porteurs de deux types de molécules de spectrine : l'une a toutes les caractéristiques de la spectrine normale; l'autre qui

représente environ 40% de la spectrine totale a pour caractéristique de ne pas se fixer sur la protéine 4.1, tant sur la colonne de protéine 4.1 sepharose, que dans les expériences utilisant la protéine 4.1 ^{125}I . Aucune autre interaction n'est perturbée. L'anomalie est située semble-t-il sur la chaîne β à l'extrémité opposée aux sites de fixation de l'ankyrine et de la phosphorylation. La présence de deux types de molécules traduit bien l'état hétérozygote classique de la sphérocytose héréditaire. Il est proposé de dénommer variante I ce type de maladie, bien défini par son anomalie fonctionnelle.

(b) Anomalies des groupes sulfhydryles de la spectrine au cours de la sphérocytose héréditaire : chez près de la moitié des malades atteints de sphérocytose héréditaire, surtout dans les cas atypiques par l'absence de l'une quelconque des caractéristiques habituelles de la maladie, il existe une diminution modérée et globale de la spectrine portant sur les chaînes α et β et mise en évidence sur les gels de polyacrylamide par l'étude du rapport spectrine/bande 3. Le déficit est en moyenne de l'ordre de 10% et peut atteindre 30%. Chez les mêmes sujets, la quantité de dimère de spectrine dans les membranes et dans l'extraction à 4°C est normale mais la constante d'association dimère-dimère in vitro est légèrement diminuée (4 à $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ pour une normale de $6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \pm 0,4$).

La signification de ces anomalies est incertaine. Le rôle des groupes sulfhydryles de la spectrine est probable : en présence de réducteurs, l'épreuve de tétramérisation est normalisée (D. Dhermy *et coll.* résultats non publiés). De plus, l'oxydation ménagée des groupes SH d'une spectrine normale reproduit l'anomalie de l'interaction spectrine-protéine 4.1 décrite dans la sphérocytose héréditaire de type I et la réduction secondaire corrige le trouble d'interaction [23]; deux conclusions peuvent en être tirées : d'une part, qu'un des groupements SH de la spectrine est impliquée dans la sphérocytose héréditaire de type I (mais il n'a pas été démontré que le trouble de ce type de sphérocytose pouvait être reversé par la

réduction des groupes SH de la spectrine pathologique); d'autre part, qu'il pouvait être suspecté que certaines au moins des anomalies décrites soient secondaires à des phénomènes d'oxydation des groupes SH et non dues à une anomalie moléculaire structurelle primitive.

(c) Déficit en spectrine et sphérocytose héréditaire récessive : une maladie différente de la sphérocytose héréditaire classique a été décrite comme une grande microsphérocytose à transmission récessive. Elle est supportée par une diminution de plus de 50% de la spectrine dans les hématies du propositus; ce déficit porte plus sur la chaîne α que sur la chaîne β et n'est pas retrouvée chez les parents. Les techniques immunologiques ne mettent pas en évidence de spectrine ou de produits de dégradation de celle-ci dans les hémolysats. Le mécanisme de ces altérations quantitatives reste incertain et la possibilité d'une protéolyse ne peut pas être totalement exclue [24].

Anomalies de la protéine 4.1

Elles constituent la seconde classe d'anomalies moléculaires des elliptocytoses constitutionnelles. Jusqu'ici les anomalies de la protéine 4.1 n'ont été rencontrées que chez des sujets de race blanche. Le pourcentage d'elliptocytes varie d'un cas à l'autre, de même que l'aspect plus ou moins allongé des érythrocytes. La transmission est autosomale dominante. Dans les formes homozygotes qui sont jusqu'ici exceptionnelles, existe une anémie hémolytique sévère, améliorée par la splénectomie, accompagnée d'elliptocytose, de poïkilocytose, de sphérocytose. Une absence totale de protéine 4.1 est objectivée par l'électrophorèse des protéines membranaires [25]. La protéine de liaison entre la protéine 4.1 et le reste de la membrane qui est la glycophorine C (glycoprotéine β ou glycoconnectine) manque elle aussi. Cette absence paraît secondaire à celle de la protéine 4.1. Dans les formes hétérozygotes, l'hémolyse est modérée ou inapparente, les

hématies plus ovalaires qu'allongées; l'analyse des protéines membranaires met en évidence un déficit d'environ 50% de la protéine 4.1; la quantité de glycophorine C y semble normale. Le mécanisme génétique du déficit en protéine 4.1 semble hétérogène; certains cas semblent dus à un défaut de synthèse de la protéine; d'autres à la production d'une protéine instable; dans ces derniers cas l'électrophorèse met en évidence, à côté du déficit en 4.1, la présence de bandes colorées en position anormale; l'emploi d'anticorps monoclonaux anti-protéine 4.1 permet d'identifier ces bandes à des produits de dégradation de la protéine 4.1 [26]. Ces mêmes études ont permis de reconnaître également un polymorphisme génétique de la protéine 4.1 dépourvu de tout caractère pathologique [27]. Le rôle du déficit en protéine 4.1 dans l'elliptocytose héréditaire a été discuté; il existe cependant un modèle animal : une lignée de chiens a été reconnue dans laquelle coexistaient une anémie hémolytique avec elliptocytose et un déficit de la protéine 4.1 [28].

Anomalies de l'ancrage du squelette

Les cas rapportés sont moins démonstratifs et l'authenticité des lésions moléculaires fonctionnelles moins solidement établie que dans les cas précédents.

Dans certaines sphérocytoses héréditaires, une inextractibilité de la spectrine a été rapportée [29]. Dans d'autres, la fixation du complexe spectrine-actine sur les vésicules retournées témoignerait d'une diminution du nombre de sites de fixation; le siège de l'anomalie serait plutôt sur l'ankyrine que sur la spectrine.

Dans deux familles avec elliptocytose, poïkilocytose et hyperhémolyse, les vésicules retournées déplétées en ankyrine ne fixaient pas l'ankyrine normalement, alors que l'ankyrine des patients se fixait normalement à des vésicules déplétées provenant d'hématies témoins. Il a été suggéré que l'anomalie primitive était portée par la bande 3 plutôt que par l'ankyrine [30] ■

Summary

Progress achieved in recent years in the knowledge of the proteins of the erythrocyte membrane skeleton have enabled scientists to define the molecular basis of certain congenital diseases of the red blood cell and to demonstrate their heterogeneity. The most specific anomalies are related to *spectrin* and protein 4.1, for which methods of study have been well-defined and standardized. Several variants of alpha and beta chains of *spectrin* have been discovered in the course of constitutional elliptocytosis; located on the segments of chains believed to be involved in the formation of *spectrin tetramers*, their presence inhibits the formation of *tetramers* and leads to an instability of the skeleton. Identical variants have been observed in hereditary pyro-poikilocytosis. An anomaly of *spectrin* affecting the segment of the beta chain responsible for interacting with protein 4.1 has been described in hereditary spherocytosis. Different types of protein 4.1 deficits have been detected in hereditary elliptocytoses. Anomalies in the attachment of the skeleton have been encountered in different types of congenital hemolytic anemias.

TIRÉS A PART

P. Boivin, Inserm U160, Hôpital Beaujon, 92118 Clichy Cedex.