m/s MINI-SYNTHÈSE

médecine/sciences 1995 ; 11 : 752-4

L'allèle α^{LELY}, un allèle tranquille, mais dangereux, du gène α-spectrine érythroïde

La spectrine est la principale protéine du squelette érythrocytaire et contribue de façon déterminante aux propriétés mécaniques des hématies. Nous décrirons brièvement les propriétés d'un allèle fréquent du gène α-*spectrine* érythroïde, l'allèle α^{LELY} (LELY: *low expression Lyon*). N. Alloisio *et al.* [1] ont découvert et caractérisé cet allèle à travers une étude patiente d'allèles α-*spectrine* responsables d'elliptocytose héréditaire. Son investigation débouche sur des problèmes fondamentaux, concernant la nucléation du dimère αβ de la spectrine et la régulation du saut d'un petit exon.

La molécule de spectrine est un tétramère α2β2 qui se forme en deux temps

Une molécule de spectrine contient deux chaînes α (2429 acides aminés; gène localisé en 1q22-q23) et deux chaînes β (2137 acides aminés; gène localisé en 14q23-q24.2). Sur presque toute leur longueur, les chaînes de spectrine présentent une succession de segments homologues de 106 acides aminés [2]. Chaque segment homologue est à son tour replié dans l'espace en une unité conformationnelle, avec un décalage de phase, cependant, une unité conformationnelle commençant en position 26 d'un segment homologue [3] *(figure 1)*. L'assemblage de la spectrine comprend deux temps: la dimérisation, puis l'autoassociation des dimères.

La dimérisation est enclanchée par la reconnaissance réciproque d'un site de nucléation sur la chaîne α et d'un site complémentaire sur la chaîne β. Les chaînes étant disposées de façon antiparallèle, les sites de nucléation impliquent les segments homologues α18 à α21, et β1 à β4, respectivement, sur les chaînes α et β. Après nucléation, les deux chaînes α et β finissent de s'accoler, longitudinalement, à la façon d'une fermeture éclair, pour former le dimère αβ.

L'autoassociation de deux (ou plusieurs) dimères met en jeu d'autres sites complémentaires. L'un se trouve dans la région N-terminale de la chaîne α (segment homologue α1), l'autre dans la région C-terminale de la chaîne β (segment homologue β17). De la sorte, deux dimères s'articulent tête à tête, chaque site α interagissant (de façon complexe) avec le site β complémentaire *(figure 1)*. Notons que les sites de nucléation et les sites d'autoassociation se situent aux deux extrémités des chaînes α et des chaînes β, donc des dimères αβ eux-mêmes.

L'elliptocytose héréditaire, quand elle résulte d'une mutation du gène α *spectrine*, a une expression très variable au sein d'une famille donnée

D'une manière générale, l'elliptocytose héréditaire (HE) est due à des mutations des gènes α-*spectrine*, β-*spectrine*, ou *protéine 4.1*. Les mutations du gène α-*spectrine*, responsables d'HE, ou mutation α^{HE}, se

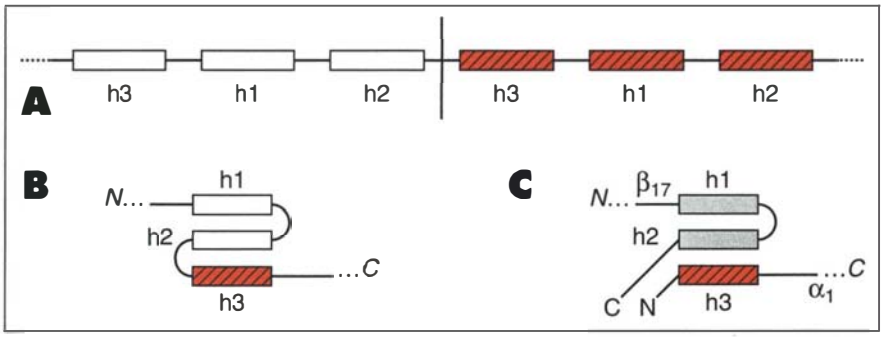

Figure 1. ***Rapport d'un segment homologue et d'une unité conformationnelle au sein des chaînes α et β de la spectrine. A.*** *Deux segments homologues contigus. Selon le modèle de Speicher et Marchesi [2], chaque segment homologue contient, notamment, trois sous-segments α-hélicoïdaux, h3, h1 et h2.* ***B.*** *Unité conformationnelle. Les hélices 1 et 2 d'un segment homologue se combinent avec l'hélice 3 du segment homologue suivant.* ***C.*** *Articulation tête à tête d'une chaîne α (segment homologue α1) et d'une chaîne β (segment homologue β17) après autoassociation de deux dimères de spectrine. Une structure mimant une unité conformationnelle est produite, en dépit d'une solution de continuité covalente.*

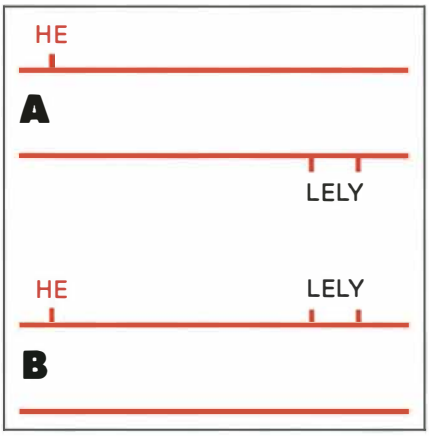

Figure 2. ***Les situations en* trans *ou en* cis *d'une mutation* α^{HE} *et du déterminant* α^{LELY}.** *Chaque trait représente un allèle α-spectrine (dans la direction 5'→ 3')* ***A.*** *Situation en* trans*: l'allèle* α^{LELY}*, d'expression faible, augmente l'expression de l'allèle* α^{HE}*.* ***B.*** *Situation en* cis*: le déterminant* α^{LELY} *atténue l'expression de la mutation* α^{HE}*, maintenant située sur le même allèle.*

situent dans, ou à proximité du site d'auto-association. On remarquait depuis longtemps que les mutations α^{HE}, et non les autres, présentaient dans presque toutes les familles concernées une expression modérée (voire nulle), ou une expression grave ou très grave, l'elliptocytose se muant volontiers, dès lors, en poïkilocytose. Quelle que fût la gravité de la mutation α^{HE} en cause, il existait toujours deux niveaux d'expression possibles.

Ces données suggérèrent l'existence, dans les formes graves, d'un allèle faible en *trans* de l'allèle α^{HE}. Encore convenait-il que cet allèle fût suffisamment fréquent pour induire des sautes de gravité au sein de virtuellement toutes les familles ayant un allèle α^{HE}. Nous avons tracé, puis caractérisé cet allèle, qui fut appelé successivement « facteur de sensibilisation » [4], allèle $\alpha^{V/41}$ [1], d'après la nomenclature des cartes peptidiques de la spectrine, enfin allèle α^{LELY} [5].

L'allèle α^{LELY} provoque le saut partiel de l'exon 46, situé dans le site de nucléation de la chaîne α

La moitié des transcrits issus de l'allèle α^{LELY} sont dépourvus de l'exon 46, un petit exon (18 nucléotides) normalement constitutif [5]. Les six acides aminés correspondants se trouvent dans le site de nucléation de la chaîne α de la spectrine. L'allèle α^{LELY} porte, en outre, une substitution de base (C → T) en position – 12 de l'intron 45, et une autre substitution en position 7 de l'exon 40: 1857 CTA → GTA; Leu → Val [5]. Des tests sont actuellement en cours pour savoir si la mutation en position – 12 de l'intron 45 déclenche le saut partiel de l'exon 46. Dans cette région riche en pyrimidine, on a déjà rapporté, au sein d'autres transcrits, des substitutions susceptibles d'influencer le sort de l'exon immédiatement en 3' [6, 7]. L'autre mutation de l'allèle α^{LELY}, se situant en position 7 de l'exon 40, est, pensons-nous, un polymorphisme fonctionnellement neutre. Nous appellerons déterminant α^{LELY} l'ensemble de ces deux mutations en *cis* l'une de l'autre.

Il restait à démontrer formellement

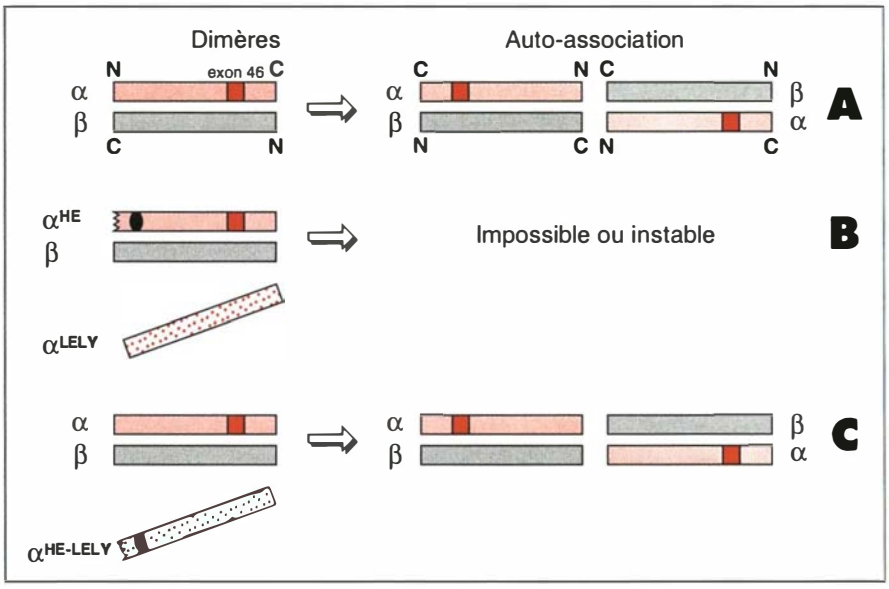

Figure 3. ***Mécanismes possibles de la modulation par l'allèle*** α^{LELY} ***de la gravité de la mutation*** α^{HE} ***de l'elliptocytose (ovale noir).*** ***A:*** *chez un sujet sain Lely* $^{-/-}$*, les dimères αβ s'autoassocient normalement. Les sous-unités α possèdent le peptide codé par l'exon 46, proche du centre de nucléation de la spectrine α, intervenant dans la dimérisation.* ***B:*** *chez un double hétérozygote* $\alpha^{LELY}/\alpha^{HE}$*, 50 % des sous-unités* α^{LELY}*, sans la mutation de l'elliptocytose, ont perdu l'exon 46 et se dimérisent moins bien avec les sous-unités β que les sous-unités* α^{HE}*, d'où un excès de dimères* α^{HE}/β*incapables de s'autoassocier, ce qui explique l'aggravation du phénotype.* ***C:*** *chez les sujets hétérozygotes pour un allèle portant à la fois la mutation HE et le déterminant LELY mutés, dont une grande partie auront perdu l'exon 46, les double mutants* $\alpha^{HE\text{-}LELY}$ *seront sous-représentés dans les dimères formés qui pourront donc s'associer normalement, atténuant le phénotype. Les extrémités carboxy (C) et aminoterminales (N) sont indiquées. La mutation HE est schématisée par une ligne brisée à l'extrémité N-terminale des chaînes α impliqué dans l'auto-association des dimères entre eux avec contact α/β.*

** Ces chaînes α portent la mutation 1857 (exon 40) qui n'a pas de retentissement fonctionnel.*

que l'absence de l'exon 46 empêche le recrutement de la chaîne α correspondante par la chaîne β. L'utilisation de fragments recombinants et d'un test de liaison (travail accompli en collaboration avec D. Speicher, The Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA) établit la validité de cette hypothèse (Wilmotte *et al.*, manuscrit en préparation).

L'allèle α^{LELY} seul, en *trans* ou en *cis* d'un allèle α^{HE}

Les chaînes α et, à un moindre degré, les chaînes β de la spectrine sont synthétisées en grand excès. Quand il est seul, l'allèle α^{LELY} est inoffensif. Même à l'état homozygote, où 50 % des chaînes α (dépourvues des acides aminés codés par l'exon 46) ne sont pas recrutées, il demeure suffisamment de chaîne α* avec ces acides aminés pour satisfaire aux besoins de la cellule érythroïde en dimères de spectrine.
Si l'allèle α^{LELY} est en *trans* d'un allèle α^{HE} qui, dans le cas envisagé, n'a pas le déterminant α^{LELY} (100 % des transcrits possèdent l'exon 46), la chaîne α^{HE} est recrutée avec plus d'efficacité (50 % des transcrits α^{LELY}, en *trans*, ont perdu l'exon 46 et donnent lieu à des chaînes α inutilisables). La cellule assemble plus de dimères $\alpha^{HE}\beta$ que de dimère αβ*. Elle se trouve dès lors piégée par la prédominance des dimères $\alpha^{HE}\beta$. En effet, ces derniers s'autoassocient mal ou pas du tout (les mutations α^{HE} se situant dans ou à proximité du site d'autoassociation). L'elliptocytose, causée par l'allèle α^{HE}, s'en trouve aggravée, souvent de façon dramatique.
Des recombinaisons génétiques ou des événements *de novo* peuvent, au contraire, placer en *cis* l'un de l'autre une mutation α^{HE} et le déterminant $\alpha^{HE-LELY}$ *(figure 2)*. Dans ce cas, c'est au contraire la chaîne α^{LELY} issue de l'allèle $\alpha^{HE-LELY}$ qui subira une baisse de recrutement. Les dimères αβ sains l'emporteront sur les dimères $\alpha^{HE-LELY}$* et, de façon très logique, l'elliptocytose s'en trouvera atténuée [8].

L'allèle α^{LELY} est fréquent et probablement très ancien

L'allèle α^{LELY} a une fréquence relativement uniforme au sein de divers groupes ethniques (Caucasiens: 30 % ; Noirs Africains: 20 %; Japonais: 21 %; Chinois: 20 %) [9]. Ce caractère répandu suggère que l'allèle α^{LELY} est apparu avant que ne divergent les lignées ayant conduit aux groupes ethniques d'aujourd'hui. La constance des fréquences, l'absence de recombinaison entre les mutations de l'exon 40 et l'intron 45, posent des questions non résolues à l'heure actuelle.

Conclusion

La découverte de l'allèle α^{LELY} résulta d'études patientes sur l'elliptocytose héréditaire. Tous les laboratoires, dans le domaine, ont confirmé son existence et ses propriétés [10, 11]. Ainsi, les silences de la spectrine parlent, pour reprendre le titre d'une récente rubrique « News and Views », consacrée par W. Gratzer à l'allèle α^{LELY}, dans la revue *Nature* [12] ■

Remerciements

Les auteurs remercient les membres du laboratoire qui ont participé à la caractérisation de l'allèle α^{LELY}, les nombreuses familles qui ont offert leur sang, et Madame N. Connan qui a préparé le manuscrit. Ce travail fut soutenu par le Centre national de la recherche scientifique (URA 1171; PICS 221), l'université Claude-Bernard Lyon-I, l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (CRE 930405), l'Association francaise contre les myopathies, la Fondation pour la recherche médicale, la Région Rhône Alpes, et l'Institut Pasteur de Lyon.

Jean Delaunay
Rick Wilmotte
Nicole Alloisio
Joëlle Maréchal

Unité de recherche associée 1171 du Cnrs, génétique moléculaire humaine, Institut Pasteur de Lyon, avenue Tony-Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France.

TIRÉS À PART

J. Delaunay.

RÉFÉRENCES

1. Alloisio N, Morlé L, Maréchal J, Roux AF, Ducluzeau MT, Guetarni D, Pothier B, Baklouti F, Ghanem A, Kastally R, Delaunay J. $Sp\alpha^{V/41}$: a common spectrin polymorphism at the αIV-αV domain junction. Pertinence to the expression level of hereditary elliptocytosis due to α-spectrin variants. *J Clin Invest* 1991; 87: 2169-77.

2. Speicher DW, Marchesi VT. Erythrocyte spectrin is comprised of many homologous triple helical segments. *Nature* 1984; 311: 177-80.

3. Winograd E, Hume D, Branton D. Phasing the conformational unit of spectrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10788-91.

4. Guetarni D, Roux AF, Alloisio N, Morlé F, Ducluzeau MT, Forget BG, Colonna P, Delaunay J, Godet J. Evidence that expression of $Sp\alpha^{1/65}$ hereditary elliptocytosis is compounded by a genetic factor which is linked to the homologous α-spectrin allele. *Hum Genet* 1990; 85: 627-30.

5. Wilmotte R, Maréchal J, Morlé L, Baklouti F, Philippe N, Kastally R, Kotula L, Delaunay J, Alloisio N. Low expression allele α^{LELY} of red cell spectrin is associated with mutations in exon 40 ($\alpha^{V/41}$ polymorphism) and intron 45 and with partial skipping of exon 46. *J Clin Invest* 1993; 91: 2091-6.

6. Beldjord C, Lapoumeroulie C, Pagnier J, Benabadji M, Krishnamoorthy R, Labie D, Bank A. A novel β thalassemia gene with a single base mutation in the conserved polypyrimidine sequence at the 3' end of IVS 2. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 4927-36.

7. Huie ML, Chen AS, Tsujino S, Shanske S, Dimauro S, Engel AG, Hirschhorn R. Aberrant splicing in adult onset glycogen storage disease type II (GSDII): molecular identification of an IVS1 (– 13T → G) mutation in a majority of patients and a novel IVS10 (+1GT → CT) mutation. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 2231-6.

8. Randon J, Boulanger L, Maréchal J, Garbarz M, Vallier A, Ribeiro L, Tamagnini G, Dhermy D, Delaunay J. A variant of spectrin low-expression allele α^{LELY} carrying a hereditary elliptocytosis mutation in codon 28. *Br J Haematol* 1994; 88: 534-40.

9. Maréchal J, Wilmotte R, Kanzaki A, Dhermy D, Garbarz M, Galand C, Tang TK, Yawata Y, Delaunay J. Ethnic distribution of allele α^{LELY}, a low expression allele of red cell spectrin α-gene. *Br J Haematol* 1995 (sous presse).

10. Hanspal M, Hanspal JS, Sahr KE, Fibach E, Nachman J, Palek J. Molecular basis of spectrin deficiency in hereditary pyropoikilocytosis. *Blood* 1993; 82: 1652-60.

11. Gallagher PG, Forget BG. Spectrin St Louis and the α^{LELY} allele. *Blood* 1994; 84: 1686-7.

12. Gratzer WB. Silence speaks in spectrin. *Nature* 1994; 372: 620-1.