

Le facteur von Willebrand et ses anomalies moléculaires

Le facteur décrit par von Willebrand (FvW) est une glycoprotéine de grande taille et de structure multimérique. Il se lie à des récepteurs à la surface des plaquettes et aux parois vasculaires, et il fixe et stabilise le facteur VIII anti-hémophilique A. Son déficit, d'une part empêche l'adhérence plaquettaire, d'autre part provoque un déficit secondaire en facteur VIII ; sa transmission, contrairement à celle de l'hémophilie, est autosomique. *m/s* a résumé les connaissances d'il y a trois ans [1], alors que l'ADNc avait été cloné mais n'avait pas encore été utilisé pour l'analyse moléculaire du déficit, qui a fait tout dernièrement des progrès spectaculaires.

Le gène du FvW est localisé sur le bras court du chromosome 12 près de sa portion terminale ; on connaît par ailleurs un pseudo-gène sur le chromosome 22, qui doit être pris en compte pour éviter des erreurs d'analyse [2]. Le gène s'étend sur plus de 150 kb, compte au moins 50 exons, est transcrit en un messageur d'environ 9 kb et code pour une molécule de 2 813 acides aminés ; un peptide signal de 22 acides aminés et un pro-peptide de 741 acides aminés laissent une molécule mature de 2 050 acides aminés. Le FvW circulant possède près de 20 % de glucides. La structure de la molécule avec ses différents domaines est représentée sur la figure 1. Le monomère a une taille de 200 kDa ; la forme circulante contient des agrégats allant de 450 à 20 000 kDa.

Le déficit en FvW, marqué surtout par des hémorragies, est de gravité très variable. Biologiquement on distingue plusieurs types de déficit [3], le plus souvent mais non toujours

transmis selon un mode autosomique dominant. Le type I comporte uniquement des anomalies quantitatives : la baisse du taux de FvW diffère d'un malade à l'autre ; la formation des multimères n'est pas perturbée ; cette catégorie, probablement destinée à être démembrée, n'a pas encore dévoilé ses anomalies moléculaires éventuelles.

Le type II présente des altérations qualitatives : la population des multimères est diminuée. On en reconnaît deux sous-groupes principaux : dans les deux cas on trouve une modification d'affinité pour une glycoprotéine plaquettaire, la GP1b, mais alors que cette affinité est diminuée dans le type IIA, elle est augmentée dans le type IIB. On a décrit enfin un type III, de transmission habituellement récessive, dans lequel, chez l'homozygote, aucune molécule de FvW n'est détectable, et qui, dans ce cas, est d'une haute gravité. Des anomalies moléculaires ont été décou-

vertes dans trois formes biologiques du déficit en FvW.

(1) Les premières lésions moléculaires ont été trouvées dans le type III. Dans certaines formes sévères — mais non dans toutes —, des délétions ont été mises en évidence. Elles peuvent être totales [4, 5] ou partielles, comme celle décrite dans l'exon 42 par Peake *et al.* [6]. Les membres hétérozygotes de ces familles sont cliniquement normaux, à l'exception d'un seul, présumé hétérozygote composite pour la délétion et une autre mutation. Un point remarquable est que, jusqu'à présent, c'est seulement dans les formes avec absence totale de FvW que l'on trouve des allo-anticorps après perfusion de préparations du facteur [4]. Il n'y a pas d'exception connue, contrairement aux exemples des hémophilies A et B.

(2) Dans les différentes formes de type II ont été décrites des mutations ponctuelles. Dans le type IIA, à

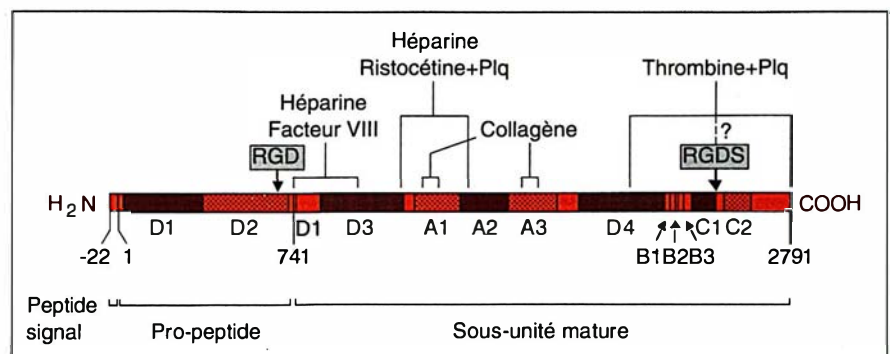


Figure 1. **Structure-fonction du FvW.** Les domaines sont délimités avec leurs liaisons spécifiques. Les séquences d'adhérence RGD et RGDS sont indiquées. Plq = plaquettes. (D'après [3] modifié.)

notre connaissance, quatre mutations ont été identifiées (figure 2). Elles s'inscrivent toutes quatre [7, 8] dans un très court segment de la molécule, qui va des acides aminés 834 à 865, situés dans le domaine A2 ; ce domaine ne semble pas correspondre à une zone fonctionnelle définie, mais il existe [9] en position 842-843 une liaison sensible aux protéases dépendant du calcium ; une mutation dans cette région pourrait avoir comme effet d'accroître la protéolyse de la molécule ; de fait, on observe des fragments de taille inférieure à celle du monomère intact, qui sont absents chez les sujets normaux.

(3) C'est dans le type IIB que les résultats, qui datent des derniers mois, sont les plus impressionnants. Rappelons que ce type est reconnu en raison de son affinité accrue pour son récepteur sur les plaquettes, la glycoprotéine 1b-IX ; *in vitro*, la liaison se fait spontanément, et la présence de l'intermédiaire utilisé habituellement, un antibiotique appelé ristocétine, n'est plus nécessaire. De plus, le taux de FvW des plaquettes n'est pas abaissé. On disposait ainsi d'un fil conducteur pour la recherche de mutations : le domaine de liaison du FvW à la protéine 1b occupe la région 480-718 de la sous-unité mature, codée par l'exon 28 du gène. En partant de l'ARNm ou de l'ADN génomique, on peut amplifier et séquencer la zone critique. Trois groupes [10-12] ont décrit simultanément des mutations ponctuelles probablement responsables de maladies de von Willebrand. Plusieurs caractères ressortent de ces travaux : (a) la région critique se situe dans le domaine A1 entre les acides aminés 509 et 695, unis par une liaison disulfure ; celle-ci délimite une boucle dont plusieurs positions se sont montrées atteintes par des mutations ; le nombre de ces mutations s'est montré limité, cinq mutations ayant été définies pour 17 familles indépendantes ; (b) certaines mutations sont plus fréquentes et sont retrouvées par plusieurs auteurs ; (c) la plupart des mutations sont héréditaires et peuvent être suivies sur plusieurs générations dans ces

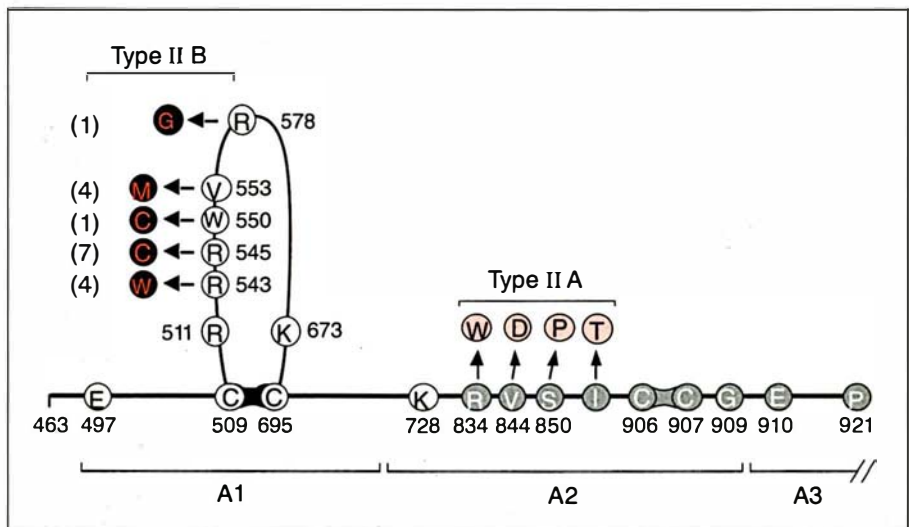


Figure 2. **Les mutations connues de l'exon 28 dans les déficits en FvW.** Le segment codé par l'exon 28 entre les acides aminés 463 et 921 est figuré. Les liaisons disulfure sont indiquées. On a mis en évidence la boucle entre les acides aminés 509 et 695, ainsi que les domaines A1, A2 et A3. La position lys 728 est celle de la coupure tryptique séparant le site de liaison à la GP1b (cercles blancs) du reste de la molécule (cercles noirs). Les mutations de la région A2 (type IIA) sont indiquées en noir sur fond rouge, celles de la région A1 (type IIB) en rouge sur fond noir. Entre parenthèses, le nombre de familles indépendantes dans lesquelles une même mutation a été trouvée. R = Arg ; G = Gly ; M = Met ; V = Val ; C = Cys ; W = Trp ; E = Glu ; S = Ser ; I = Ile ; D = Asp ; P = Pro ; T = Thr. (D'après Randi et al. [9] modifié.)

formes dominantes, mais certaines se sont produites *de novo*, au moins deux (d'après [9]) ; ces dernières occupent des positions que l'on trouve également dans des formes héréditaires. En réunissant les données des trois articles, on peut conclure que trois positions se partagent 90 % des mutations détectées ; de plus, les cinq mutations différentes sont comprises entre les acides aminés 543 et 578, et quatre d'entre elles, totalisant 16 familles sur 17, sont ramassées dans un intervalle de 10 acides aminés, sans doute particulièrement critique pour le contact avec la GP1b (figure 2).

Certes, pour la plupart des mutants, il ne s'agit que de « candidats » à représenter la cause de la maladie, puisque la simple constatation d'un changement d'acide aminé n'entraîne pas forcément de conséquences pathologiques. On en a d'ailleurs décrit un [10] qui n'est pas délétère et ne représente qu'un variant rare (Arg⁶³⁶ His). Seuls Ware *et al.* [11] ont été plus loin dans l'analyse du seul

mutant qu'ils aient trouvé. Ils ont préparé des fragments recombinants du domaine 449-728, qu'ils ont fait exprimer dans des bactéries ; le fragment contenant la séquence mutée se liait directement à la GP1b, le témoin réclamant la présence de ristocétine, confirmant le rôle effectif de la mutation dans l'anomalie qui est à la base de la maladie. Le mécanisme de la disparition des hauts polymères dans le type IIB tient probablement à l'élimination de la circulation des multimères se fixant aux plaquettes par l'intermédiaire de la GP1b.

La transmission dominante laisse synthétiser 50 % de formes normales. La combinaison de molécules normales et anormales ne permet pas de stabiliser les multimères et explique l'atteinte clinique des hétérozygotes. Au contraire, dans le type III, le gène délété ou muté ne fabrique aucune molécule viable ; celles que produit l'hétérozygote sont normales et suffisent, en général, pour assurer une hémostase correcte ; l'homozygote, totalement dépourvu

de FvW, est atteint d'une forme sévère.

La rapidité des progrès récents fait espérer l'élucidation proche de la plupart des syndromes de von Willebrand. Le problème le plus difficile semble celui du type I, le plus fréquent. La taille de la molécule rend difficile de trouver l'angle d'attaque correct alors que rien ne vient orienter la recherche. Il est probable cependant que des anomalies existent. On peut rapprocher ces maladies des thalassémies, dans lesquelles les molécules d'hémoglobine paraissent normales, alors que de multiples mutations ont été découvertes dans les gènes qui codent pour les globines, gènes de petite taille plus faciles à explorer. Le déficit en FvW de type I pourrait être qualifié de « thalassémie de l'hémostase » et il devrait être bientôt possible d'en aborder l'étude moléculaire ■

Jean-Claude Dreyfus

RÉFÉRENCES

1. Dreyfus JC. Actualité du facteur Willebrand. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 50-1.
2. Ginsburg D, Handin, RI, Bonthron DT, *et al.* Human von Willebrand factor (VWF) : isolation of cDNA clones and chromosomal localization. *Science* 1985 ; 228 : 1401-6.
3. Sadler JE. Von Willebrand disease. In : Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*. New York : McGraw-Hill, 1989 : 2171-88.
4. Shelton-Inloes BB, Chehab FF, Manucci PM, Federici AB, Sadler JE. Gene deletions correlate with the development of alloantibodies in von Willebrand disease. *J Clin Invest* 1987 ; 79 : 1459-65.
5. Ngo KY, Glotz VT, Koziol JA, *et al.* Homozygous and heterozygous deletions of the von Willebrand factor gene in patients and carriers of severe von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 2753-7.
6. Peake IR, Liddell MB, Moodie P, *et al.* Severe type III von Willebrand's disease caused by deletion of exon 42 of the von Willebrand factor gene : family studies that identify carriers of the condition and a compound heterozygous individual. *Blood* 1990 ; 75 : 654-61.
7. Ginsburg D, Konkle BA, Gill JC, *et al.* Molecular basis of human von Willebrand disease : analysis of platelet von Willebrand factor mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 3623-7.
8. Iannuzzi MC, Hidaka N, Boehuke M, *et al.* Analysis of the relationship of von Willebrand disease (vWD) and hereditary hemorrhagic telangiectasia and identification of a potential type IIA vWD mutation (Ile865 to Thr). *Am J Hum Genet* 1991 ; 48 : 757-63.
9. Dent JA, Berkowitz SD, Ware J, Kasper CK, Ruggieri ZM. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 6306-10.
10. Randi AM, Rabinowitz I, Mancuso DJ, Mannucci PM, Sadler JE. Molecular basis of von Willebrand disease type IIB. *J Clin Invest* 1991 ; 87 : 1220-6.
11. Cooney K, Nichols WC, Bruck ME, *et al.* Molecular defect in type IIB von Willebrand disease. *J Clin Invest* 1991 ; 87 : 1227-33.
12. Ware J, Dent JA, Azuma H, *et al.* Identification of a point mutation in type IIB von Willebrand disease illustrating the regulation of von Willebrand factor affinity for the platelet membrane glycoprotein IB-IX receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 2946-50.