

## ADAMTS 13, la protéase spécifique du facteur von Willebrand

Jean-Pierre Girma, Agnès Veyradier, Dominique Meyer

> Très récemment deux équipes [1, 2] ont purifié une nouvelle métalloprotéase indispensable à l'équilibre hémostatique. Cette protéase de la famille "ADAMTS" (*a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif*) agit en clivant le facteur von Willebrand (vWF), une glycoprotéine multimérique essentielle à l'adhérence et l'agrégation des plaquettes.

### Régulation du facteur Willebrand par sa protéase spécifique

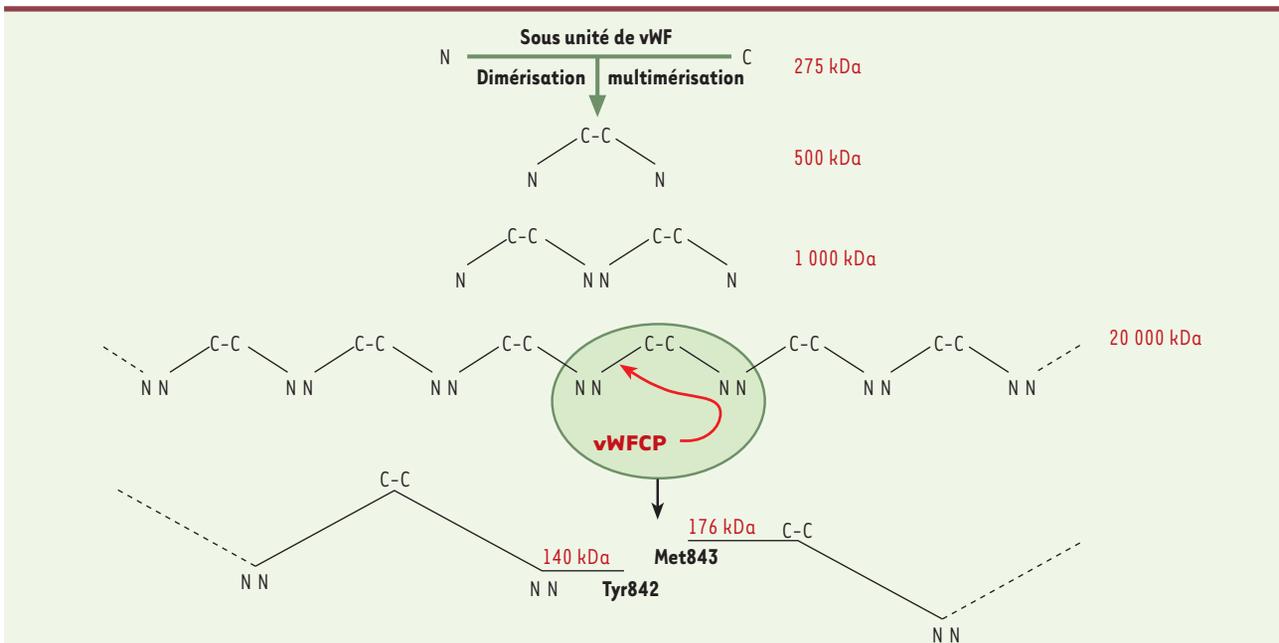
Le vWF est synthétisé par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes sous la forme d'un précurseur. La

sous-unité mûre (275 kDa) est composée de 2050 acides aminés (aa) comportant 5 types de domaines d'homologie structurale D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-C1-C2-CK. C'est au niveau du domaine A2 qu'est situé le site de clivage par la vWFPC (CP pour *cleaving protease*) [3]. Le vWF mûr est composé, via des ponts disulfures, d'une série de multimères allant de 500 kDa (dimère) à plus de 20 000 kDa, formée par un agencement linéaire des sous-unités, dans une configuration alternée N-N, C-C, N-N, C-C (Figure 1).

Après lésion de l'endothélium, le vWF joue le rôle essentiel de pont molé-

culaire d'une part entre le sous-endothélium découvert et des récepteurs plaquettaires et, d'autre part, entre les plaquettes, aux forces de cisaillement élevées observées dans la microcirculation et dans

les artères sténosées. Ainsi, il promeut l'adhérence irréversible des plaquettes au sous-endothélium et contribue à l'agrégation plaquettaire. Pour assurer ces fonctions, les multimères les plus longs sont les plus efficaces, puisqu'ils contiennent à la fois le plus grand nombre de sites d'interaction du vWF avec ses divers ligands et une longueur suffisante pour joindre deux ligands entre eux. De manière physiologique, le vWF synthétisé dans les cellules endothéliales contient des multimères de très haut poids moléculaire (THPM) qui ne sont pas normalement présents dans le plasma en raison de l'action de la vWFPC.



**Figure 1. Structure multimérique du vWF et protéolyse physiologique des multimères par la vWFPC** Au cours de la maturation, les sous-unités de vWF (275 kDa) dimérisent par des ponts disulfures C-terminaux (500 kDa) et les dimères multimérisent par des ponts disulfures N-terminaux pour former des polymères, dans une configuration alternée N-N, C-C, N-N, C-C, pouvant atteindre 20 000 kDa. La protéase spécifique du vWF (vWFPC) coupe les sous-unités des multimères de manière aléatoire entre la Tyr842 et la Met843 pour former des multimères plus courts terminés par des fragments de sous-unités N-terminaux de 140 kDa et C-terminaux de 176 kDa.

Ainsi, en limitant la taille des multimères plasmatiques, la vWFCP inhibe leur fixation spontanée aux plaquettes et prévient la formation anormale de microagrégats plaquettaires. Plus précisément, la vWFCP agit par hydrolyse limitée des sous-unités de vWF au niveau de la liaison Tyr842 -Met843 du domaine A2 [3]. Les extrémités des multimères circulants tronqués sont constituées de fragments de sous-unités, respectivement N-terminaux (140 kDa) et C-terminaux (176 kDa) [4] (Figure 1).

Par ailleurs, alors que ces propriétés fonctionnelles de la vWFCP sur le vWF sont connues depuis près de quinze ans, la purification ainsi que l'identification de la structure de la protéase et de son gène sont très récentes [1, 2, 5, 6]. Le séquençage de l'extrémité N-terminale de la vWFCP a permis de localiser son gène sur le chromosome 9q34 et de déduire la séquence totale de la protéine [5]. De plus, simultanément à ces travaux, une autre équipe a utilisé une stratégie de clonage positionnel pour l'identification du gène [6]. Le gène codant pour la vWFCP comprend 29 exons et l'ARNm complet est présent seulement au niveau du foie. La vWFCP est une métalloprotéase, treizième membre identifié de la famille "ADAMTS" (→). La pré-pro-vWFCP est une chaîne de 1427 aa (Figure 2). Elle comprend un peptide signal (33 aa) et un

propeptide (41 aa) dont la séquence C-terminale est compatible avec son élimination par la furine. La protéase mature est glycosylée. Sa masse moléculaire est de 190 kDa. Elle comprend un domaine métalloprotéase avec deux sites potentiels de coordination d'ions divalents, l'un pour le calcium et l'autre pour le zinc, un domaine de type désintégrine, huit domaines thrombospondine de type 1, un domaine riche en cystéines contenant une séquence RGDS potentiellement impliquée dans des interactions avec des intégrines, un domaine de type ADAMTS spacer et deux domaines CUB. La présence d'au moins sept isoformes de la protéine par épissage alternatif du gène suggère l'existence de plusieurs variants fonctionnels.

### Implication de la vWFCP dans le purpura thrombotique thrombocytopénique

Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) est une microangiopathie thrombotique rare, mais souvent fatale qui se caractérise par une anémie hémolytique, une thrombopénie et des lésions ischémiques multiviscérales liées à la présence d'agrégats plaquettaires riches en vWF dans la microcirculation. La première association entre le PTT et un défaut de protéolyse du vWF a été décrite en 1982 par Moake et al. [7] qui ont identifié dans le plasma de patients atteints de formes récidivantes de PTT, des multimères de THPM

susceptibles de provoquer une agrégation plaquettaire spontanée. Plus récemment cette hypothèse a été renforcée par la découverte de l'absence totale d'activité de la vWFCP chez les patients atteints de PTT. Ce défaut d'activité enzymatique paraît lié soit à l'absence de protéase active dans les formes congénitales [8, 9], soit à la présence d'IgG autoimmunes inhibitrices dans les formes acquises [9, 10]. De plus, la physiopathologie des formes chroniques multirécidivantes de PTT a été documentée grâce au séquençage du gène de la vWFCP dans sept familles de PTT congénitaux. Le caractère héréditaire du déficit de l'activité de la protéase a été objectivé grâce à l'identification de 12 mutations dans le gène codant pour la vWFCP. Dans tous les cas, ces mutations sont associées à un statut de double hétérozygote compatible avec une transmission autosomique récessive [6].

### Rôle de la vWFCP dans la maladie de Willebrand de type 2A

La maladie de Willebrand (vWD) est la pathologie hémorragique héréditaire la plus fréquente. Parmi ses nombreux sous-types, le variant 2A est caractérisé par une réactivité très réduite du vWF pour ses ligands plaquettaires et sous-endothéliaux, consécutive à l'absence de multimères de HPM dans le plasma. Les mutations de type 2A sont pour la plupart localisées autour du site de protéolyse du vWF [11] et induisent le

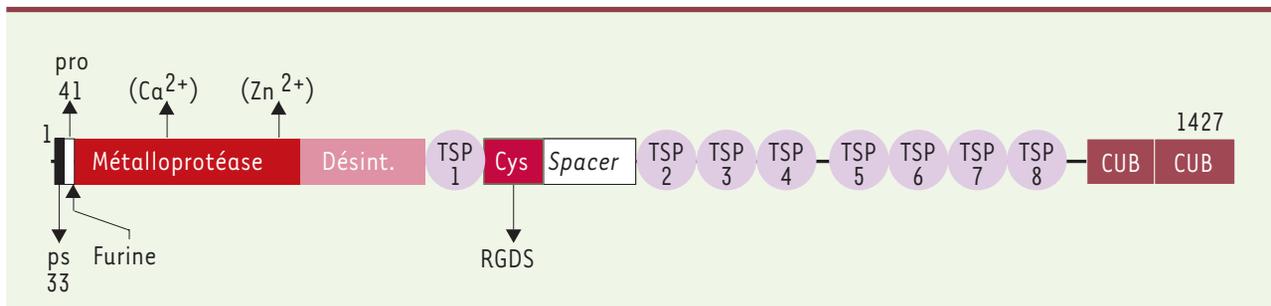


Figure 2. Domaines d'homologie structurale et fonctionnelle de la vWFCP ou ADAMTS 13 (d'après [5]). La pré-pro-protéine comprend un peptide signal (ps), un propeptide (pro), un domaine métalloprotéase avec ses sites de coordination pour les ions Ca<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup>, un domaine désintégrine (Désint.), huit domaines thrombospondine de type 1 (TSP), un domaine riche en cystéines avec sa séquence RGDS (Cys), un domaine ADAMTS spacer et deux domaines CUB.



plus souvent une hypersensibilité du vWF muté à l'action de la vWFPC. Ce mécanisme a été mis en évidence soit indirectement en caractérisant des vWF recombinants mutés exprimés par des cellules eucaryotes transfectées, soit directement par l'étude de la susceptibilité de vWF recombinants mutés à la vWFPC

[12]. En revanche à ce jour aucune anomalie fonctionnelle du vWF induite par un excès d'activité de la vWFPC n'a été identifiée.

En conclusion, ces deux exemples (PTT et vWD type 2A) illustrent bien à quel point une anomalie du couple substrat/enzyme, vWF/vWFPC, peut altérer l'équilibre de la balance hémostatique et induire une pathologie hémorragique ou thrombotique. Si l'effet des modifications du vWF-substrat est particulièrement bien documenté, les relations entre la structure et les fonctions de l'enzyme vWFPC restent encore à élucider. La purification et le séquençage de l'ADN de cette métalloprotéase doivent per-

mettre à court terme des avancées significatives dans la compréhension de son rôle physiopathologique. ♦

### ADAMTS 13, a new metalloprotease required to cleave von Willebrand factor

1. Gerritsen HE, Robles R, Lammler B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood* 2001; 98:1654-61.
2. Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* 2001; 98:1662-6.
3. Dent JA, Berkowitz SD, Ware J, Kasper CK, Ruggeri ZM. Identification of a cleavage site directing the immunochromatographic detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6306-10.
4. Berkowitz SD, Dent J, Roberts J, et al. Epitope mapping of the von Willebrand Factor subunit distinguishes fragments present in normal and type IIA von Willebrand disease from those generated by plasmin. *J Clin Invest* 1987; 79:524-31.
5. Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. Structure of von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001; 276 : 41059-63.
6. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001; 413:488-94
7. Moake JL, Rudy CK, Troll JH, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1982; 307:1432-5.
8. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lammler B. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1997; 89:3097-103.
9. Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998; 339:1578-84.
10. Tsai HM, Lian ECY. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1998; 339:1585-94.
11. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Ann Rev Biochem* 1998; 67:395-424.
12. Tsai HM, Sussman II, Ginsburg D, Lankhof H, Sixma JJ, Nagel RL. Proteolytic cleavage of recombinant type 2A von Willebrand factor mutants R834W and R834Q: Inhibition by doxycycline and by monoclonal antibody VP-1. *Blood* 1997; 89:1954-62.

## NOUVELLE

### La méthylation des histones : une marque de domaines chromatinien ?

Estelle Nicolas, Olivier Vaute, Laurence Vandell, Didier Trouche

> La méthylation des histones, quasiment inconnue il y a encore un an, est maintenant devenue la star des congrès dans le domaine de la régulation trans-

criptionnelle. Nous avons écrit une synthèse à ce propos il y a maintenant six mois [1], mais un certain nombre de

développements récents méritent que l'on y revienne.

Les histones peuvent être méthylées sur des résidus lysines (K4, 9 et 27 de H3 et K20 de H4), mais aussi, comme cela vient tout juste d'être montré, sur des arginines [2]. Nous ne discuterons ici que la méthylation des histones sur les lysines.

Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, UMR 5099 Cnrs, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex, France.