

Le clonage du facteur Willebrand

A côté des hémophilies A et B, l'un des plus importants troubles de l'hémostase est le déficit en facteur Willebrand (WF). Les facteurs VIII et IX ont été clonés en 1984 (voir *médecine/sciences* 85; 1 : 50 et 330). Le facteur Willebrand vient de l'être par trois groupes différents aux États-Unis [1-4]. Le déficit en WF, qui se transmet comme un caractère autosomique (contrairement aux hémophilies A et B) provoque des symptômes de sévérité très variable. A l'état hétérozygote, il se traduit par un saignement prolongé après coupure et, chez les femmes, par des règles très abondantes. Certaines formes bénignes peuvent passer inaperçues. Les rares cas homozygotes sont d'une haute gravité.

Sur le plan physiologique le WF est impliqué dans deux réactions différentes, l'adhérence des plaquettes à la paroi vasculaire et la formation du caillot lui-même. Le facteur est une glycoprotéine de taille supérieure à 200 kilodaltons pour le monomère, et dérivant d'un précurseur d'environ 300 kd. Il est synthétisé, non par les hépatocytes, mais par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Après la biosynthèse, se forment des dimères qui s'unissent lors de la sécrétion dans le plasma, en agrégats hétérogènes allant de 450 à 20 000 kd. Les sujets déficients se divisent en deux types : diminution du taux sans changement des propriétés d'agrégation, ou altération de ces dernières avec impossibilité de former des multimères. Dernière propriété capitale du WF, dans le plasma il est le support du facteur VIII C ou antihémophilique A, à raison de 99 % de WF pour 1 % de VIII C; il en découle d'une part, qu'un déficit important en WF entraîne secondairement un déficit en VIII C plasmatique; d'autre part, que les premiers anticorps que l'on croyait dirigés contre le VIII C l'étaient en réalité contre le WF. L'analyse des relations entre WF et VIII C passionne depuis longtemps les chercheurs.

Le clonage a été réalisé par des méthodes différentes selon les expérimentateurs, à partir de cellules endothéliales en culture. Le travail est moins avancé que pour les facteurs VIII et IX. Les auteurs ne font état que de fragments d'ADN complémentaire, mais l'identité de ces fragments a été établie de façon irréfutable. On a pu obtenir une séquence partielle, monter que le messenger correspondant est de grande taille (9 kb) et localiser le gène du WF sur le bras court du chromosome 12 [1]. La production du WF par génie génétique n'est donc pas encore à l'ordre du jour mais des problèmes très importants et mal compris vont pouvoir être abordés; nous n'en citerons que les principaux : identité ou non identité du WF produit par les cellules endothéliales et par les mégacaryocytes, dont les propriétés ne sont pas tout à fait les mêmes; interprétation moléculaire des formes cliniques multiples du déficit en WF, qualifié par certains de « thalassémie de la coagulation »; relations physiologiques et moléculaires entre WF et VIII C; enfin, et ce n'est peut-être pas le moindre problème, rôle du WF qui déborde sans doute les frontières de l'hémostase. L'adhérence des plaquettes à la paroi vasculaire jouerait en effet un rôle dans le développement de l'athérosclérose. Des variations qualitatives ou quantitatives du WF pourraient donc intervenir pour en accélérer ou en retarder l'apparition. C'est là le principal centre d'intérêt de certains des groupes qui analysent le gène du facteur Willebrand.

J.-C. D.

1. Ginsburg D, Handin RI, Bonthron D, *et al.* Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* 1985; 228: 1401-6.
2. Lynch DC, Zimmermann TS, Collins CJ, *et al.* Molecular cloning for human von Willebrand factor: authentication by a new method. *Cell* 1985; 41: 49-56.
3. Sandler E. *Proc Natl Acad Sci USA* (sous presse).
4. Kolata G. Clotting protein cloned. *Science* 1985; 228: 1415-7.

Une enzyme qui perd son chemin

Gâce au génie génétique, toutes les anomalies imaginables du gène lui-même ont été découvertes en pathologie, notamment dans les thalassémies. On pourrait donc considérer l'étude des maladies héréditaires monogéniques comme périmée. C'est compter sans les protéines qui, contrairement à l'hémoglobine, ne restent pas dans le cytoplasme où elles ont pris naissance, mais subissent des migrations et des modifications post-traductionnelles. Pour les protéines exportées vers les organites subcellulaires ou vers le plasma, il subsiste bien des inconnues, dont chacune peut être à l'origine de maladies : signaux de passage hors du cytoplasme, addition de glucides ou d'autres ligands, aiguillage vers la destination correcte, signaux de reconnaissance pour y être accepté, maturation finale le plus souvent par protéolyse ménagée, tous ces signaux constituant autant de pièges possibles. A ces situations, dont on commence à connaître des exemples, vient à présent s'ajouter un inédit : une enzyme qui s'embourbe dans une ornière du chemin et qui est incapable d'en sortir.

Le déficit en sucrase-isomaltase est une des maladies qui provoquent l'« intolérance aux sucres ». Sa fréquence est discutée mais certainement

variable selon les ethnies puisqu'elle atteindrait 10% chez les Esquimaux. Sous forme d'un précurseur de taille supérieure à 200 000 daltons, l'enzyme voyage à travers le réticulum endoplasmique, puis l'appareil de Golgi, où elle se glycosyle pour aboutir à la surface des microvilli intestinaux, où des protéases la scindent en sucrase et isomaltase. Les sujets déficients ne peuvent utiliser le saccharose et l'isomaltose et leur capacité d'utiliser le maltose est franchement diminuée.

Les travaux antérieurs portant sur la muqueuse intestinale totale concluaient tantôt à la présence, tantôt à l'absence de protéine immunoréactive. Des auteurs suisses [1] ont eu l'idée de combiner la technique des anticorps monoclonaux et la microscopie électronique. Ils ont ainsi pu localiser la protéine dans la membrane microviltaire chez les sujets normaux, alors que chez le malade la quasi-totalité était restée dans l'appareil de Golgi. D'autres techniques ont montré que la quantité de protéine immunoréactive était du même ordre que chez les témoins et qu'il s'agissait du précurseur apparemment normalement glycosylé. Le précurseur avait donc été synthétisé, avait traversé sans encombre le réticulum endoplasmique mais n'avait pu franchir l'ultime étape pour atteindre la surface de la cellule. La présence dans la muqueuse intestinale d'une activité normale de lactase prouvait que l'ensemble de l'appareil de Golgi n'était pas en cause. Cette « panne » spécifique d'une enzyme en route vers sa destination normale n'a pas encore reçu d'explication satisfaisante.

J.-C. D.

Les souris transgéniques au secours des immunologistes cellulaires

La technologie des animaux transgéniques, les souris avant tout, sera détaillée dans un prochain numéro de *médecine/sciences*. En bref, il s'agit de microinjecter un gène cloné dans un pronucleus d'œuf fécondé, de réimplanter cet œuf dans l'animal conditionné et, après la naissance des embryons, de détecter ceux des animaux nouveau-nés qui ont intégré le gène injecté. Cet ADN exogène intégré se transmet comme un caractère héréditaire mendélien; exprimé de manière correcte, il confère alors un nouveau caractère héréditaire à la descendance de l'animal transgénique.

De récents succès viennent d'être obtenus par cette méthode avec des gènes codant pour les antigènes de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Frels *et al* [1] ont ainsi introduit un gène porcin de classe I du CMH dans une souris dont toutes les cellules se sont avérées positives pour l'expression de l'antigène porcin. Une greffe de peau de l'animal transgénique à une souris normale de la souche parentale est rapidement rejetée, preuve que l'antigène porcin est fonctionnel. Des expériences ultérieures diront en outre si le gène introduit permet aux souris transgéniques d'acquérir une nouvelle spécificité restreinte de leurs lymphocytes T cytotoxiques, qui pourraient ainsi reconnaître non seulement des cellules exprimant les antigènes de classe I du CMH murin, mais aussi des cellules n'exprimant que l'antigène porcin.

Les antigènes de classe II (antigènes A et E, chacun constitué de deux types de chaîne, α et β) sont reconnus par les cellules T « helper » (auxiliaires) et leur expression est requise pour le développement normal de l'immunité contre certains antigènes. Une souche de souris ayant ainsi une délétion partielle du gène E_α n'exprime pas l'antigène E à la surface de ses cellules et ne répond pas à l'immunisation par un antigène synthétique tel que le polyglutamyl-lysyl-phénylalanine.

Trois équipes, dont celle de Pierre Gerlinger et de Christophe Benoist dans le laboratoire du Pr Chambon à Strasbourg, viennent de réussir à corriger tous ces défauts par microinjection d'un gène E_α normal dans les œufs fécondés de souris de la souche mutante. Les possibilités ainsi ouvertes de modifier chez l'animal l'expression de leurs antigènes d'histocompatibilité, voire de provoquer l'expression d'antigènes « artificiels » obtenus *in vitro* par fabrication de gènes hybrides, devraient offrir aux immunologistes cellulaires des outils incomparables pour analyser les phénomènes complexes du développement du système immunitaire et des mécanismes de reconnaissance par les cellules lymphocytaires T.

A. K.

1. Hauri HP, Roth J, Srechi EE, Lentze MJ. Transport to cell surface of intestinal sucrase-isomaltase is blocked in the Golgi apparatus in a patient with congenital sucrase-isomaltase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 85; 82, 4423-7.

1. Frels WI, Bluestone JA, Hodes RJ, *et al*. Expression of a microinjected porcine class I major histocompatibility complex gene in transgenic mice. *Science* 1985; 228; 577-80.
 2. Le Meur M, Gerlinger P, Benoist C, Mathis D. Correcting an immune response deficiency by creating E_α gene transgenic mice. *Nature* 1985; 316; 38-42.
 3. Yamanura KI, Kibutani H, Folsom V, *et al*. Functional expression of a microinjected E_α gene in C 57 BL/6 transgenic mice. *Nature* 1985; 316; 67-9.
 4. Pinkert, *et al.*, cité par Steffmetz M. Immune response restored by gene therapy in mice. *Nature* 1985; 316; 14-5.