

Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la maladie de Willebrand

Contribution of molecular biology to the diagnosis of von Willebrand disease

Christophe ZAWADZKI^{1,3,4}, Pierre BOISSEAU^{2,3,4}

1. Institut d'Hématologie-Transfusion, Université de Lille, CHU de Lille, Lille, France.
 2. Laboratoire de Génétique Médicale, CHU de Nantes, Nantes, France.
 3. Centre de Référence de la Maladie de Willebrand, Lille, France.
 4. Réseau national Génostase des laboratoires de biologie moléculaire des pathologies de l'hémostase, France.
- Courriel : christophe.zawadzki@chru-lille.fr

RÉSUMÉ

La maladie de Willebrand (VWD) est l'une des pathologies hémorragiques constitutionnelles les plus fréquentes, dont le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments clinico-biologiques intégrant la symptomatologie du patient, les dosages plasmatiques du facteur Willebrand (VWF) et l'analyse moléculaire du gène *VWF*. La disponibilité du séquençage à haut débit a permis d'accélérer le génotypage des patients étudiés par le Centre de Référence de la Maladie de Willebrand (CRMW), aboutissant chez la plupart d'entre eux à un diagnostic définitif. Cette évolution facilite l'accès des patients à une thérapeutique optimisée, à une enquête familiale simplifiée et à un conseil génétique avec possible diagnostic prénatal dans la VWD type 3. L'analyse moléculaire joue un rôle décisif pour i) caractériser les déficits quantitatifs (différenciation d'une VWD type 1 d'un statut de transmetteur type 3 et identification d'une VWD type 1 sévère), ii) identifier les sous-types 2B permettant ou non l'utilisation de la desmopressine, iii) détecter les RIPA « faussement positives », et iiiii) identifier les hétérozygoties composites à l'origine de phénotypes complexes comme les 2N/3. Le génotypage complète aussi utilement les dosages plasmatiques spécialisés du VWF pour i) identifier les VWD type 1C à clairance accélérée, ii) déterminer les sous-types 2A et 2M, iii) identifier les VWD de type indéterminé, et iiiii) différencier une maladie constitutionnelle d'un syndrome de Willebrand acquis. La biologie moléculaire est donc aujourd'hui un outil indispensable à la caractérisation des patients atteints de maladie de Willebrand.

Mots clés : maladie de Willebrand, analyse moléculaire, gène *VWF*.

ABSTRACT

Von Willebrand disease (VWD) is one of the most frequent germline bleeding disorder, and its diagnosis is based on the combination of clinical and biological arguments integrating the patient symptomatology, plasma Willebrand factor (VWF) assays and molecular analysis of the *VWF* gene. The availability of high-throughput sequencing has increased the number of genotyped patients included in the French Willebrand Disease Reference Center, leading to a definitive diagnosis for most of them. This facilitates their access to optimized treatments, easier family investigation and genetic counseling with a possible antenatal diagnosis in type 3 VWD. Molecular analysis plays a crucial role to i) characterize quantitative deficiency (differentiation of type 1 VWD from type 3 carrier and identification of severe type 1 VWD), ii) identify 2B VWD subtypes in which desmopressin use is allowed or not, iii) detect "false positive" RIPA, iiiii) identify composite heterozygotes associated with complex phenotypes such as 2N/3. Genotyping also increases efficiency of specialized VWF plasma assays to i) identify

type 1C VWD with accelerated clearance, ii) determine 2A and 2M VWD subtypes, iii) identify undetermined VWD and iv) differentiate a germline VWD from an acquired von Willebrand syndrome. Therefore, molecular biology is today an essential tool for the characterization of patients with VWD.

Keywords: Von Willebrand disease, molecular analysis, *VWF* gene.

Rev Francoph Hémost Thromb 2021 ; 3 (2) : 61-8.

INTRODUCTION

La maladie de Willebrand (VWD) est une pathologie hémorragique constitutionnelle très polymorphe dans son expression clinique et biologique. La détermination du type de VWD dont est atteint le patient est de première importance dans sa prise en charge médicale. Ce typage est possible grâce aux dosages plasmatiques du facteur Willebrand (VWF), qu'ils soient de première ligne ou spécialisés, et que l'analyse moléculaire du gène *VWF* complète utilement **1,2**. Cette évaluation phénotypique et moléculaire permet au patient de bénéficier d'une thérapeutique optimisée, d'une enquête familiale facilitée et d'un conseil génétique en cas de maladie de Willebrand de type 3 (VWD3). En France, l'analyse moléculaire complète donc systématiquement les

dosages plasmatiques pour la caractérisation des patients inclus au Centre de Référence de la Maladie de Willebrand (CRMW). L'objectif de cet article est de présenter les principaux éléments diagnostiques des types et sous-types de VWD, et l'apport de l'étude moléculaire respectivement dans chacune de ces catégories (**Tableau 1**).

LA PROTÉINE VWF

Le VWF est une glycoprotéine circulante de 2 050 acides aminés, synthétisée par le mégacaryocyte et la cellule endothéliale, et qui est hautement multimérisée et organisée en de multiples domaines **3-6**, sites de liaison à ses ligands naturels (**Figure 1**). Il joue un rôle clé dans l'hémostase primaire (adhésion et agrégation plaquettaire) et dans la coagulation

Tableau 1 : Situations où la biologie moléculaire joue un rôle décisif ou complémentaire de l'analyse phénotypique dans le diagnostic d'une maladie de Willebrand (VWD).

Table 1: Specific cases in which molecular biology plays a crucial or complementary role to phenotype analysis in the diagnosis of von Willebrand disease.

		Rôle décisif	Complément de l'analyse phénotypique
Type 1		<ul style="list-style-type: none"> Différencier une VWD1 d'un transmetteur type 3 Identifier une « VWD1 sévère » Différencier une VWD constitutionnelle d'un « VWF à taux bas » 	<ul style="list-style-type: none"> Identifier une VWD1C à clairance accélérée
Type 2	Sous-type 2A		<ul style="list-style-type: none"> Définir le sous-type 2A(IIA), 2A(IIC), 2A(IID) et 2A(IIE)
	Sous-type 2B	<ul style="list-style-type: none"> Définir le sous-type « 2B type 1 », « 2B classique » et « 2B thrombopénie » Explorer les RIPA positives et parfois artéfactuelles Différencier d'un pseudo-Willebrand (gène <i>GPIBA</i>) 	
	Sous-type 2M		<ul style="list-style-type: none"> Définir le sous-type 2M classique, 2M(2A-like), 2M collagène
	Sous-type 2N	<ul style="list-style-type: none"> Définir si 2N/2N (homozygotie) ou 2N/3 (hétérozygotie composite) 	
Type 3		<ul style="list-style-type: none"> Différencier une VWD3 d'une « VWD1 sévère » Identifier les variants à risque d'alloimmunisation Conseil génétique et diagnostic prénatal 	
Types complexes		<ul style="list-style-type: none"> Identifier les hétérozygoties composites 	
Types « indéterminés »			<ul style="list-style-type: none"> Identifier les « types indéterminés »
Syndrome de Willebrand acquis			<ul style="list-style-type: none"> Différencier une VWD constitutionnelle d'un syndrome de Willebrand acquis

(liaison au facteur VIII le protégeant d'une protéolyse prématurée). Des processus post-traductionnels, tels qu'une O et N-glycosylation, ainsi qu'une dimérisation et multimérisation, permettent d'aboutir à un VWF biologiquement actif pouvant aller jusqu'à 20 000 kDa **5**. La taille des multimères de plus haut poids moléculaire (HPM) est régulée par la métalloprotéase ADAMTS13 **7**. De nombreuses cystéines, concentrées dans les domaines D', D3, C1-C6 et CK, contribuent au repliement, à la dimérisation et à la multimérisation du VWF (Figure 1).

RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU VWF

Les valeurs physiologiques d'activité VWF:Act et d'antigène VWF:Ag plasmatiques sont variables (50 à 150 %), et reflètent la complexité de la régulation de l'expression du VWF qui serait environnementale pour un tiers et génétique pour deux tiers **8**. Le taux de VWF plasmatique est souvent la résultante d'un variant *VWF* délétère à pénétrance forte et de variants régulateurs qu'il faut dorénavant prendre en compte dans la compréhension du phénotype biologique global en intégrant les origines ethniques et géographiques du patient **9,10**. L'effet de ces variants modulateurs du

gène *VWF* peut être simplement additif ou épistatique **11**. Les gènes de glycosylation comme *ABO*, *FUT1* et *FUT2* codant des fucosyltransférases et *ST3GAL4* une sialyltransférase, influencent fortement la synthèse et la clairance du VWF et expliqueraient plus de 40 % de ses fluctuations de concentrations sanguines **12,13**. Les gènes *AVPR2*, *ACE*, *STX2*, *STXBP1* et *STXBP5* ont un effet sur la sécrétion du VWF. Les gènes *LRP*, *CLEC4M*, *STAB2* et *SCARA5* influencent la clairance du VWF en modulant sa liaison à des récepteurs membranaires avant endocytose **14,15**. L'apport réel de ces gènes reste cependant à préciser, et ils ne sont pas encore intégrés au panel de diagnostic de routine.

LE GÈNE *VWF* ET SES TECHNIQUES D'ÉTUDE

Le gène *VWF* localisé sur le chromosome 12 comporte 52 exons sur 178 kb, est très polymorphique (580 variants uniques pathogènes retrouvés au CRMW depuis 2006 et 708 dans la base de données EAHAD), et a un pseudogène (*VWFP1*) avec lequel il partage 97 % d'homologie, ce qui favorise la conversion génique **16** (Figure 1). Ces caractéristiques font toute la difficulté du génotypage qui nécessite une expertise pour l'interprétation des variants détectés.

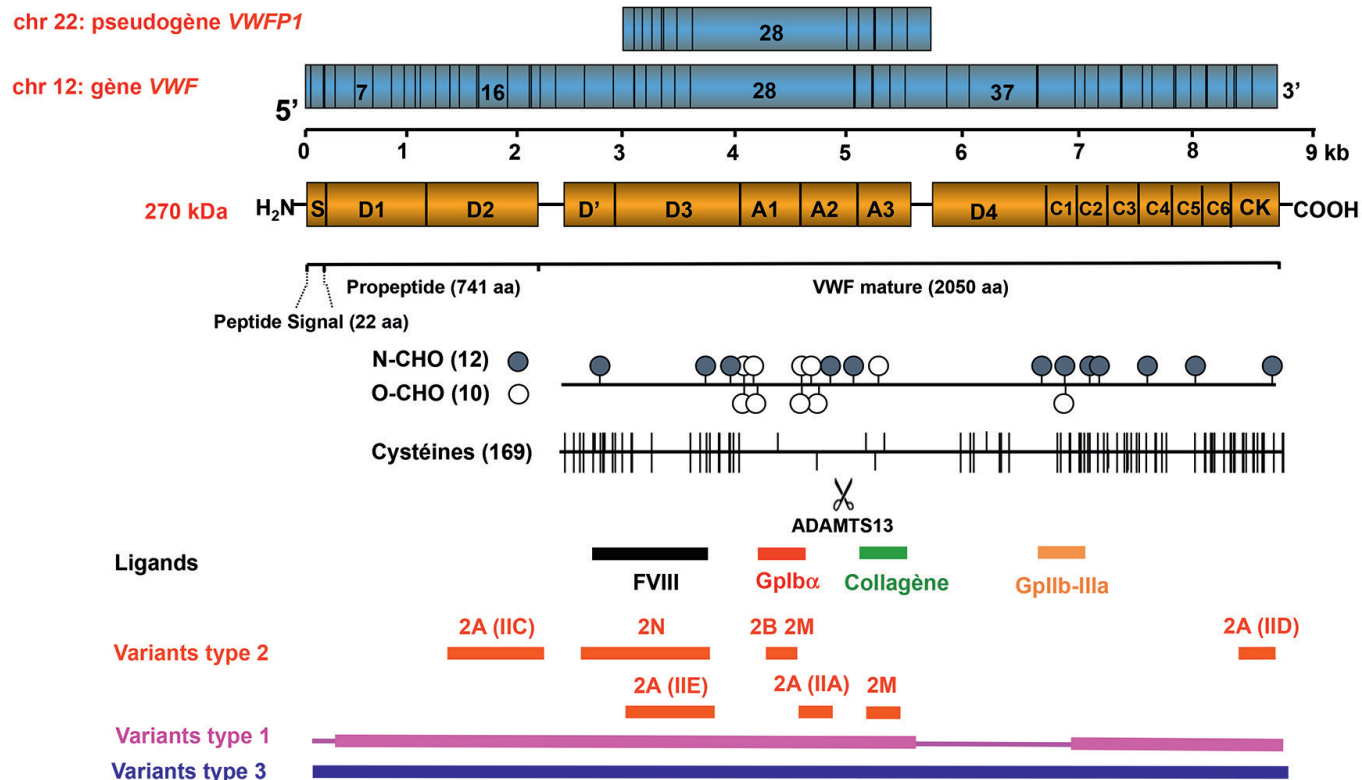


Figure 1 : Organisation du gène et de la protéine du facteur Willebrand.

Figure 1: Structure of the von Willebrand factor gene and protein.

Le séquençage à haut débit (SHD), sûr, rapide et économique, est maintenant largement utilisé pour l'étude complète de *VWF* 17. Le séquençage Sanger est réservé aux analyses familiales et aux études partielles comme celle de l'exon 28 en cas de suspicion de VWD2B. Les variations ponctuelles exoniques sont les plus fréquentes, mais il existe aussi des grands remaniements du gène qui sont détectés surtout par *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) ou PCR quantitative 18. Les hétérozygoties composites, associant deux variants délétères situés en *trans*, sont à l'origine de phénotypes complexes, comme par exemple 2N/3 ou 2B/2M. Elles ne sont pas rares, et 13 % des patients du CRMW ont d'ailleurs plusieurs variants détectés 19.

La principale difficulté du génotypage de *VWF* est l'identification fréquente de variants inconnus de la base de données EAHAD (<https://grenada.lumc.nl/LOVD2/VWF>) ou de celle du CRMW. L'effet délétère potentiel de ces nouveaux variants est alors analysé selon des critères bibliographiques, épidémiologiques, de prédictions bio-informatiques et des bases de données publiques, d'après les recommandations nord-américaines de l'ACMG/AMP 20,21 et nationales de l'ANPGM 22.

Des études fonctionnelles peuvent être utilisées pour évaluer l'effet pathogène, qu'il s'agisse de variants pouvant perturber l'épissage (séquençage de l'ARNm et construction plasmidique « minigène ») ou de variants exoniques (expression d'un mutant *VWF ex vivo*) 23.

MALADIE DE WILLEBRAND DE TYPE 1

La maladie de Willebrand de type 1 (VWD1), de transmission autosomale dominante, correspond au déficit quantitatif en VWF où activité et antigène sont diminués à un niveau similaire. Dans la littérature internationale, sa fréquence est globalement estimée à 75 % des VWD alors qu'elle ne représente que 26 % des cas en France ; cette différence s'explique en partie par les critères d'inclusion stricts du CRMW (VWF:Ag < 30 % avec un ratio VWF:Act/VWF:Ag > 0,7) 19,24.

Paradoxalement, c'est probablement le diagnostic le plus difficile à poser car, le type 1 se définissant souvent par exclusion des tests signant le type 2, la seule diminution du VWF:Ag avec un ratio VWF:Act/VWF:Ag > 0,7 ne permet pas toujours de l'affirmer. La biologie moléculaire est ici de première importance pour confirmer le diagnostic. La frontière entre VWD1 et taux bas de VWF n'est pas définie et il existe en réalité un continuum entre ces deux groupes. Il existe une relation inversement proportionnelle entre le taux de VWF:Ag et la prévalence de la VWD1. Quand le taux de VWF:Ag augmente, l'influence du gène *VWF* diminue,

alors que celle des gènes modulateurs, notamment celle du groupe sanguin ABO, croît fortement 25,26.

Les anomalies moléculaires responsables de la VWD1, majoritairement des faux-sens, peuvent être retrouvées sur la totalité du gène *VWF* mais surtout dans les domaines D1 à A3 (exons 3 à 32) et C1 à CK (exons 38 à 52). Ces variants impactent la synthèse et la sécrétion du VWF (domaines D1, D2 et par exemple p.(Thr1156Met) de D3), et représentent deux-tiers des VWD1 du CRMW. Le type 1C correspond au type 1 à clairance accélérée, et sa durée de vie plasmatique réduite est objectivée par une augmentation nette du ratio VWF propeptide/VWF:Ag avec une réponse à la desmopressine bonne mais fugace. Le chef de file de ces variants est le type 1C Vicenza p.(Arg1205His) du domaine D3, caractérisé par des multimères de très haut poids moléculaire qu'ADAMTS13 n'a pas eu le temps de protéolyser 27,28.

Un autre intérêt du génotypage est de formellement différencier un patient présentant une VWD1 d'un transmetteur d'une VWD3. Dans ce second cas, les anomalies moléculaires détectées sont souvent responsables d'un allèle nul. Il était également admis que les transmetteurs d'un type 3, porteurs hétérozygotes d'une anomalie récessive, ne présentaient pas de déficit franc en VWF. La caractérisation au CRMW de patients « type 1 sévère » présentant un déficit quantitativement très marqué et associé à un variant hétérozygote de pénétrance forte a bousculé cette idée (voir le paragraphe VWD3). Il s'agit souvent de variants tronquants qui, en combinaison avec une autre anomalie, notamment de type transmetteur type 3, peuvent être à l'origine d'authentique VWD3 19.

MALADIE DE WILLEBRAND DE TYPE 2

La maladie de Willebrand de type 2 (VWD2) correspond à une anomalie qualitative du VWF impactant sa capacité de liaison à ses ligands naturels. Dans le sous-type 2A, il existe un défaut de liaison du VWF à la GPIIb plaquettaire et au sous-endothélium par pertes des multimères de HPM, et résultant d'anomalies diverses touchant les domaines D1, D2, D3, A2 et CK. Dans le sous-type 2M, certaines anomalies du domaine A1 entraînent un déficit de liaison du VWF à la GPIIb mais avec des multimères de HPM présents, alors que d'autres anomalies de A1 sont à l'origine d'une hyperaffinité du VWF pour la GPIIb dans le sous-type 2B. Finalement, dans le sous-type 2N, le VWF présente un défaut de liaison au FVIII à cause d'anomalies localisées dans les domaines D' et D3 29.

Le type 2 est majoritaire dans le CRMW et représente 66 % des patients inclus, avec une distribution équilibrée des 4 sous-types, 2A, 2B, 2M et 2N. Le génotypage du *VWF*

est souvent contributif dans le type 2 et l'anomalie causale a été identifiée chez la totalité des 442 cas index de l'étude française de 2016 **19**. La plupart des anomalies se concentrent entre les exons 11 à 28 et dans l'exon 52. Le séquençage ciblé de l'exon 28 est souvent contributif dans les sous-types 2B, 2A(IIA) et 2M **30**. Cela permet de confirmer le diagnostic évoqué par les analyses plasmatiques spécialisées et réattribuer le type 2 à des patients étiquetés type 1 par erreur.

Le sous-type 2A

Le sous-type 2A est lui-même scindé en quatre catégories qu'il est important de connaître car associées à un risque hémorragique différent **29,31**. Le diagnostic fait appel ici au dosage de l'activité de liaison au collagène (VWF:CB) et à l'étude des multimères. Les sous-types 2A(IIA) et 2A(IIE) sont les plus fréquents, alors que 2A(IIC) et 2A(IID) sont plus rares. Dans le sous-type 2A(IIA) de transmission dominante, les variants du domaine A2 localisés autour du site de clivage d'ADAMTS13 sont à l'origine d'une protéolyse accrue du VWF (par exemple p.(Arg1597Gln) ou p.(Gly1609Arg)), les multimères de HPM sont fortement diminués, ce qui peut expliquer la symptomatologie hémorragique significative qui lui est associée. Dans le sous-type 2A(IIC), les variants des domaines D1 et D2 du propeptide perturbent la multimérisation (par exemple p.(Gly550Arg)). Dans le sous-type 2A(IID), c'est la dimérisation qui est impactée par la disparition de cystéines du domaine CK (par exemple p.(Cys2771Tyr)). Ces deux sous-types de transmission récessive, bien que plus rares, sont eux-aussi associés à des saignements plus marqués. Enfin, dans le sous-type 2A(IIE) de transmission dominante, les variants du domaine D3 impactent des cystéines nécessaires à la stabilisation du VWF, entraînant une rétention intracellulaire et une clairance accélérée (par exemple p.(Cys1101Arg) et p.(Cys1173Arg)).

La perte des multimères de HPM et la baisse du ratio VWF:CB/VWF:Ag ne sont pas constantes, surtout dans le 2A(IIE), et un élément clé du diagnostic est la mise en évidence de bandes de protéolyse sur les profils multimériques du sous-type 2A(IIA), alors qu'elles sont absentes du 2A(IIC) et anormales dans le 2A(IID). Elles sont discrètement diminuées dans le 2A(IIE), ce qui peut la faire confondre avec un type 1. Ces anomalies ne sont pas toujours faciles à détecter, et la biologie moléculaire apporte ici une aide essentielle à leur caractérisation formelle.

Le sous-type 2B

Dans le sous-type 2B de transmission dominante, les anomalies se concentrent exclusivement dans le domaine A1

codé par l'exon 28, et celles-ci lui permettent d'adopter une conformation active de liaison spontanée à la GPIIb plaquettaire **29,32**. Le diagnostic est classiquement évoqué devant une thrombopénie associée à une diminution des ratios VWF:Act/VWF:Ag et VWF:CB/VWF:Ag, avec une diminution des multimères de HPM, et confirmé par la présence d'une hyperagrégation plaquettaire aux faibles concentrations de ristocétine (RIPA positive) ou d'une hyperfixation du VWF à la GPIIb recombinante. Cependant, la thrombopénie peut être fluctuante, et les tests RIPA et de liaison à la GPIIb d'interprétation difficile ; la biologie moléculaire apporte ici encore une aide précieuse. De nouvelles recommandations internationales placent même le génotypage en amont de toutes investigations, avant même la RIPA, en cas de suspicion d'une VWD2B **1**. Un cas classique où le génotypage est mis à contribution (et parfois en urgence comme chez la femme enceinte) est la présence isolée d'une RIPA positive avec thrombopénie plus ou moins franche pour différencier une authentique VWD2B d'une RIPA artéfactuelle.

La génétique permet aussi de définir précisément le sous-type VWD2B du patient **28,32**. Dans le « 2B typique » (par exemple p.(Arg1306Gln)), ou dans le « 2B pseudo 2A » (par exemple p.(Arg1341Gln ou Trp)), la RIPA est inconstamment positive avec une thrombopénie majorée par le stress ou la desmopressine qui y est habituellement contre-indiquée. Dans le « 2B type 1 », la RIPA est souvent positive mais sans thrombopénie et avec des multimères normaux ; le plus fréquent est le 2B New York p.(Pro1266Leu) aujourd'hui considéré comme non délétère et pour lequel la desmopressine n'est pas contre-indiquée. Il existe enfin les « 2B thrombopénie constitutionnelle » plus rares, comme p.(Val1316Met), associant des anomalies nettes du VWF mais aussi affectant les plaquettes (anomalies de la mégacaryocytopoïèse à l'origine d'une thrombopénie parfois marquée avec plaquettes géantes et défaut d'agrégation plaquettaire).

La génétique permet également de différencier le VWD2B d'un pseudo-Willebrand correspondant à une hyperaffinité de la GPIIb pour le VWF (anomalie du gène *GPIBA*).

Le sous-type 2M

La VWD2M est de transmission dominante, et les anomalies moléculaires se concentrant dans l'exon 28 (domaine A1) entraînent un défaut de liaison à la GPIIb, et celles des exons 28 à 32 (domaine A3) un défaut de liaison au collagène **29**. Le tableau biologique du 2M classique associe un ratio VWF:Act/VWF:Ag nettement abaissé mais avec un ratio VWF:CB/VWF:Ag normal et des multimères de HPM conservés (par exemple p.(Gly1324Ala) ou p.(Lys1408del)). Le sous-type 2M (2A-like) présente des multimères de HPM impactés avec un

aspect de « smear » du profil et un ratio VWF:CB/VWF:Ag parfois diminué. La biologie moléculaire confirme que c'est bien un type 2M avec des anomalies localisées dans le domaine A1 (par exemple p.(Arg1315Cys) ou p.(Arg1374Cys/His/Leu)). Le sous-type 2M collagène présente un défaut de liaison au collagène de type I et III (par exemple p.(Trp1745Cys)), et plus rarement au collagène de type VI (p.(Arg1399His)) **33**. Il associe un ratio VWF:Act/VWF:Ag souvent normal avec des multimères normaux, et seul l'objectivation d'un ratio VWF:CB/VWF:Ag diminué permet de ne pas le confondre avec un type 1, ce que va confirmer la génétique. Il est important de bien identifier le type 2M car la réponse à la desmopressine est souvent mauvaise dans le 2M collagène ou incomplète dans le 2M classique et le 2M (2A-like).

Le sous-type 2N

Se caractérisant par la seule diminution du FVIII avec des VWF:Act et VWF:Ag normaux (ratio FVIII/VWF:Ag < 0,6), le sous-type 2N peut être confondu avec une hémophilie A mineure, essentiellement. Seule l'étude de la capacité du VWF à se lier au FVIII (VWF:FVIII) permet un diagnostic phénotypique et n'est retenu que pour une liaison < 15 %. Une liaison modérément diminuée entre 30 et 65 % n'explique pas le taux du FVIII, et il faut alors s'orienter vers l'analyse du gène *F8* à la recherche d'une hémophilie A ou d'un statut de conductrice **34**. Le sous-type 2N est de transmission récessive et ne s'exprime donc qu'à l'état homozygote (2N/2N) ou hétérozygote composite souvent avec un statut de transmetteur type 3 (2N/3), et seule l'analyse moléculaire pourra l'objectiver. Les variants sont surtout localisés entre les exons 18 à 20 (domaines D' et D3), et le faux-sens p.(Arg854Gln) très fréquent est retrouvé au moins sur un allèle chez 89 % des patients du CRMW (analyse non publiée, février 2020). Le variant p.(Arg854Gln) est réputé « moins sévère » que les autres avec une bonne réponse à la desmopressine et une correction importante du FVIII durant la grossesse. Les anomalies des exons 21 à 27 sont plus rares (par exemple p.(Cys1060Arg)). A noter, l'existence de variants de la jonction des domaines D2 et D' (p.(Arg763Gly) et p.(Arg760Cys)) à l'origine d'un « VWD1/2N » s'expliquant par la production quantitativement réduite d'un VWF qui a des difficultés à se lier au FVIII, vu la persistance du propeptide sur le VWF mature.

MALADIE DE WILLEBRAND DE TYPE 3

Dans le type 3, le VWF:Ag est indétectable (< 1 %), tout comme le propeptide. De nombreux patients sont étiquetés à tort type 3 sur le seul argument d'un antigène bas mais en réalité détectable. La combinaison d'un dosage de l'antigène

en ELISA et d'un génotypage permet de différencier le type 3 d'un type 1 sévère.

La transmission du type 3 est récessive et les patients sont donc hétérozygotes composites avec deux variations différentes ou homozygotes pour une même variation (consanguinité ou plus rarement disomie uniparentale) **35,36**. Dans 80 % des cas, des variants à l'origine d'un allèle nul sont retrouvés (non-sens, insertion/délétion avec décalage du cadre de lecture, variant d'épissage ou délétion/duplication d'un ou plusieurs exons). Des variants faux-sens sont détectés dans 20 % des cas. Dans la cohorte CRMW, plus de 120 variants uniques ont été retrouvés tout au long du gène *VWF*, ce qui fait du SHD une technique de choix pour les retrouver.

Le génotypage est aussi utile pour détecter les variants associés à un risque accru d'alloimmunisation, et donc de choc anaphylactique après traitement substitutif, événements qui se manifestent chez 3 à 10 % des patients. Il s'agit surtout des grands remaniements du gène, mais certains non-sens comme le p.(Gln1311*) semblent aussi induire ce risque **35**. La sévérité clinique du type 3 donne accès, pour le couple concerné, au conseil génétique et au diagnostic prénatal (DPN) en cas de grossesse. Le DPN est l'aboutissement d'une démarche pluridisciplinaire qui accompagne le couple, qu'il y ait ou non souhait d'interrompre la grossesse en cas de fœtus atteint. Il y a bien sûr nécessité de connaître auparavant le ou les variants en cause chez un premier enfant malade et chez les deux parents.

MALADIE DE WILLEBRAND DE TYPE INDÉTERMINÉ

La génétique permet aussi de mieux caractériser la VWD de type U, « *undetermined* », de phénotype complexe et non rattachée à un type ou sous-type connu.

SYNDROME DE WILLEBRAND ACQUIS

Le syndrome de Willebrand acquis est habituellement diagnostiqué sur un faisceau d'arguments clinico-biologiques qui associe une symptomatologie hémorragique récente, sans antécédents personnels et familiaux, et la présence d'une pathologie potentiellement causale (gammopathie monoclonale, valvulopathie cardiaque...). Les éléments biologiques évocateurs manquent parfois (clairance accélérée, diminution des multimères de HPM, présence d'un anticorps anti-Willebrand), et l'absence d'anomalie moléculaire à l'analyse génétique peut donc être un argument décisif du diagnostic **37**.

CONCLUSION

Le développement ces dernières années des techniques d'analyse moléculaire, notamment du SHD, a apporté une

aide décisive pour le diagnostic et la prise en charge de la VWD du patient ; en permettant une étude exhaustive, plus rapide, et à un coût financier maîtrisé du gène *VWF*. Environ 90 % des patients inclus dans le CRMW ont une anomalie génétique qui explique leur biologie. L'analyse moléculaire est un outil complémentaire aux dosages plasmatiques du *VWF* mais qu'il n'a pas vocation à remplacer. La confrontation de la symptomatologie hémorragique, du phénotype biologique et du génotype reste essentielle au diagnostic et à la

prise en charge optimale du patient, notamment lorsque de nouveaux variants non décrits sont identifiés. Cependant, il reste une petite partie des patients du CRMW chez qui le phénotype biologique n'est pas complètement expliqué par la génétique. Les études fonctionnelles, la recherche de variants introniques profonds du gène *VWF* ou d'autres sur les gènes modulateurs devraient nous aider à mieux expliquer la VWD de ces patients. ■

POINTS CLÉS À RETENIR

- Le génotypage du gène *VWF* est un élément clé du diagnostic de la VWD. La confrontation du phénotype biologique et de l'analyse moléculaire permet souvent de définir formellement le type de VWD dont est atteint le patient. Ce qui lui permet l'accès à une thérapeutique optimisée, à une enquête familiale facilitée et à un conseil génétique avec possible diagnostic prénatal dans le type 3.
- L'outil moléculaire joue un rôle décisif dans l'identification de certains types 1, types 3 et sous-types 2B. Il permet aussi la caractérisation des hétérozygoties composites dans le sous-type 2N. Il complète aussi efficacement les dosages plasmatiques pour la caractérisation des types 1C, l'identification des sous-types 2A, 2M, et la différenciation d'une maladie constitutionnelle d'un syndrome de Willebrand acquis.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

RÉFÉRENCES

1. James PD, Connell NT, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N, *et al.* ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Adv* 2021 ; 5 : 280-300.
2. Centre de Référence de la Maladie de Willebrand. Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS), maladie de Willebrand. 2021.
3. Zhou Y-F, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood* 2012 ; 120 : 449-58.
4. Sadler JE. von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost* 2009 ; 7 : 24-7.
5. Sadler JE. von Willebrand factor in its native environment. *Blood* 2013 ; 121 : 2583-4.
6. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* 2015 ; 125 : 2019-28.
7. Zander CB, Cao W, Zheng XL. ADAMTS13 and von Willebrand factor interactions. *Curr Opin Hematol* 2015 ; 22 : 452-9.
8. Swystun LL, Lillcrap D. Genetic regulation of plasma von Willebrand factor levels in health and disease. *J Thromb Haemost* 2018 ; 16 : 2375-90.
9. Bellissimo DB, Christopherson PA, Flood VH, Gill JC, Friedman KD, Haberichter SL, *et al.* *VWF* mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population. *Blood* 2012 ; 119 : 2135-40.
10. Johnsen JM, Auer PL, Morrison AC, Jiao S, Wei P, Haessler J, *et al.* Common and rare von Willebrand factor (*VWF*) coding variants, *VWF* levels, and factor VIII levels in African Americans: the NHLBI Exome Sequencing Project. *Blood* 2013 ; 122 : 590-7.
11. Borràs N, Garcia-Martínez I, Batlle J, Pérez-Rodríguez A, Parra R, Altisent C, *et al.* Unraveling the Influence of Common von Willebrand factor variants on von Willebrand Disease Phenotype: An Exploratory Study on the Molecular and Clinical Profile of von Willebrand Disease in Spain Cohort. *Thromb Haemost* 2020 ; 120 : 437-48.
12. McKinnon TAJ, Goode EC, Birdsey GM, Nowak AA, Chan ACK, Lane DA, *et al.* Specific N-linked glycosylation sites modulate synthesis and secretion of von Willebrand factor. *Blood* 2010 ; 116 : 640-8.
13. Smith NL, Chen M-H, Dehghan A, Strachan DP, Basu S, Soranzo N, *et al.* Novel Associations of Multiple Genetic Loci With Plasma Levels of Factor VII, Factor VIII, and von Willebrand Factor: The CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology) Consortium. *Circulation* 2010 ; 121 : 1382-92.
14. Ward SE, O'Sullivan JM, Drakeford C, Aguila S, Jondle CN, Sharma J, *et al.* A novel role for the macrophage galactose-type lectin receptor in mediating von Willebrand factor clearance. *Blood* 2018 ; 131 : 911-6.
15. Swystun LL, Lai JD, Notley C, Georgescu I, Paine AS, Mewburn J, *et al.* The endothelial cell receptor stabilin-2 regulates *VWF*-FVIII complex half-life and immunogenicity. *J Clin Invest* 2018 ; 128 : 4057-73.

16. Ahmad F, Kannan M, Obser T, Budde U, Schneppenheim S, Saxena R, et al. Characterization of VWF gene conversions causing von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2019 ; 184 : 817-25.
17. Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A, et al. The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014 ; 167 : 453-65.
18. Berntorp E, Ågren A, Aledort L, Blombäck M, Cnossen MH, Croteau SE, et al. Fifth Åland Island conference on von Willebrand disease. *Haemophilia* 2018 ; 24 : 5-19.
19. Veyradier A, Boisseau P, Fressinaud E, Caron C, Ternisien C, Giraud M, et al. A Laboratory Phenotype/Genotype Correlation of 1167 French Patients From 670 Families With von Willebrand Disease: A New Epidemiologic Picture. *Medicine (Baltimore)* 2016 ; 95 : e3038.
20. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015 ; 17 : 405-23.
21. Amendola LM, Jarvik GP, Leo MC, McLaughlin HM, Akkari Y, Amaral MD, et al. Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *Am J Hum Genet* 2016 ; 98 : 1067-76.
22. Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire. Homogénéisation de l'interprétation de variants de séquence générés par les analyses en NGS (NGS Diag_001, version 2). 2021.
23. Marx I, Christophe OD, Lenting PJ, Rupin A, Vallez M-O, Verbeuren TJ, et al. Altered thrombus formation in von Willebrand factor-deficient mice expressing von Willebrand factor variants with defective binding to collagen or GPIIb/IIIa. *Blood* 2008 ; 112 : 603-9.
24. James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S, et al. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: results from a Canadian cohort study. *Blood* 2007 ; 109 : 145-54.
25. Goodeve A. Genetics of type 1 von Willebrand disease. *Curr Opin Hematol* 2007 ; 14 : 444-9.
26. Peake I, Goodeve A. Type 1 von Willebrand disease: Type 1 von Willebrand disease. *J Thromb Haemost* 2007 ; 5 : 7-11.
27. Rawley O, O'Sullivan JM, Chion A, Keyes S, Lavin M, van Rooijen N, et al. von Willebrand factor arginine 1205 substitution results in accelerated macrophage-dependent clearance in vivo. *J Thromb Haemost* 2015 ; 13 : 821-6.
28. Fressinaud É. Clinical, biological and molecular diagnosis. *Hématologie* 2014 ; 20 : 30-49.
29. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCJ, Favaloro EJ, Hill FGH, Holmberg L, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* 2006 ; 4 : 2103-14.
30. Ahmad F, Jan R, Kannan M, Obser T, Hassan MI, Oyen F, et al. Characterisation of mutations and molecular studies of type 2 von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2013 ; 109 : 39-46.
31. Schneppenheim R, Michiels JJ, Obser T, Oyen F, Pieconka A, Schneppenheim S, et al. A cluster of mutations in the D3 domain of von Willebrand factor correlates with a distinct subgroup of von Willebrand disease: type 2A/IIe. *Blood* 2010 ; 115 : 4894-901.
32. Federici AB, Mannucci PM, Castaman G, Baronciani L, Bucciarelli P, Canciani MT, et al. Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients. *Blood* 2009 ; 113 : 526-34.
33. Legendre P, Navarrete A-M, Rayes J, Casari C, Boisseau P, Ternisien C, et al. Mutations in the A3 domain of Von Willebrand factor inducing combined qualitative and quantitative defects in the protein. *Blood* 2013 ; 121 : 2135-43.
34. Mazurier C, Goudemand J, Hilbert L, Caron C, Fressinaud E, Meyer D. Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001 ; 14 : 337-47.
35. Lassalle F, Zawadzki C, Harroche A, Biron-Andréani C, Falaise C, Boisseau P, et al. The homozygous variant p.Gln1311* in exon 28 of VWF is associated with the development of alloantibodies in 3 unrelated patients with type 3 VWD. *Haemophilia* 2021 ; doi: 10.1111/hae.14207. Online ahead of print.
36. Boisseau P, Giraud M, Ternisien C, Veyradier A, Fressinaud E, Lefrançois A, et al. An unexpected transmission of von Willebrand disease type 3: the first case of maternal uniparental disomy 12. *Haematologica* 2011 ; 96 : 1567-8.
37. Sauguet P, Theron A. Acquired von Willebrand syndrome and acquired haemophilia. *Hématologie* 2015 ; 21 : 295-302.