

# Les bases moléculaires de l'afibrinogénémie congénitale

M. Neerman-Arbez

## Introduction

L'afibrinogénémie congénitale est une maladie dont les symptômes s'apparentent à ceux de l'hémophilie A, puisque dans ces deux pathologies, une protéine essentielle à la coagulation sanguine (fig. 1) est déficiente: le facteur VIII pour les hémophiles A, le fibrinogène pour les patients atteints d'afibrinogénémie.

Le fibrinogène est une glycoprotéine complexe de 340 kDal, composée de trois polypeptides alpha, bêta et gamma. Ces polypeptides sont synthétisés essentiellement par l'hépatocyte et assemblés à l'intérieur de la cellule dans une molécule de structure hexamérique par la formation de nombreux ponts disulphures entre les trois chaînes [1]. Trois classes de défauts héréditaires du fibrinogène sont reconnus: les dysfibrinogénémies, les hypofibrinogénémies et les afibrinogénémies [2]. Les dysfibrinogénémies sont des conditions qualitatives, dues à la présence d'un fibrinogène anormal; plus de 80 mutations ont été caractérisées à ce jour. Les hypofibrinogénémies sont caractérisées par une déficience en fibrinogène. Il existe aussi les

hypodysfibrinogénémies, avec une concentration réduite de fibrinogène anormal. L'afibrinogénémie est la forme la plus extrême de la déficience en fibrinogène, et se transmet selon le mode autosomal récessif: les individus des deux sexes sont atteints dans les mêmes proportions, à condition d'avoir hérité de deux allèles mutés. Les porteurs d'un seul allèle muté sont asymptomatiques. Il s'agit d'une maladie très rare, avec environ 150 familles décrites. Curieusement, malgré le rôle critique du fibrinogène dans l'hémostase ainsi que dans l'angiogénèse et la réparation des tissus, la maladie est compatible avec la vie et n'est pas plus sévère que les hémophilies A ou B. Le traitement actuel consiste en des injections de fibrinogène concentré à partir du plasma, de manière prophylactique ou sur demande. Actuellement il n'y a pas de fibrinogène recombinant dans le commerce.

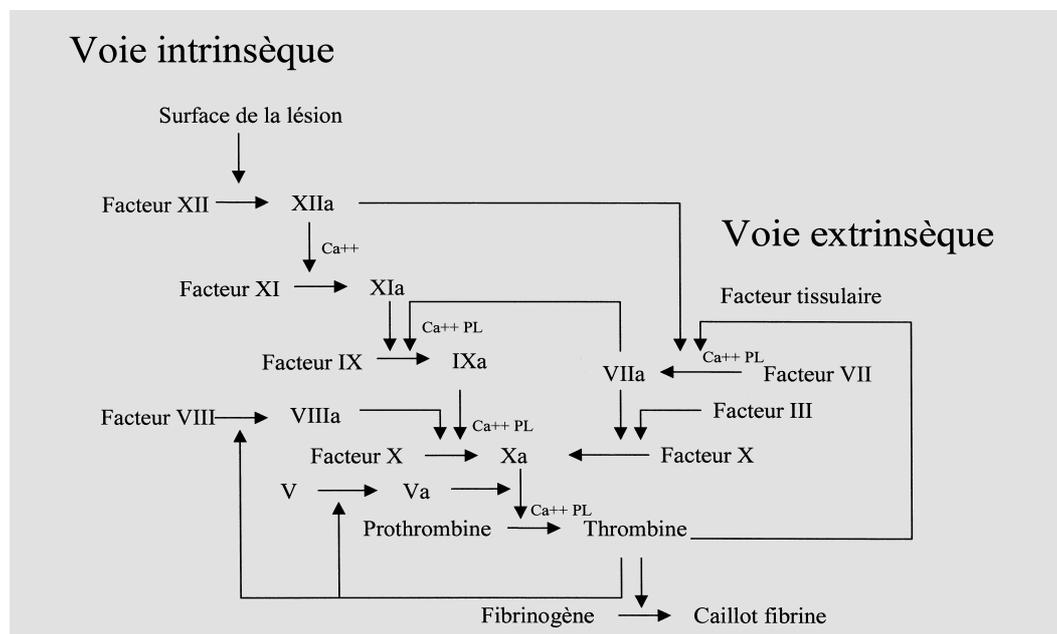
Les gènes des trois sous-unités du fibrinogène se trouvent sur le chromosome 4 (4q28-q31), dans une petite région de 50 kilobases [3]. Les trois ARNs messagers sont exprimés séparément mais avec une régulation apparemment commune. Etant donné que l'afibrinogénémie héréditaire est connue depuis 1920, lorsqu'elle fut décrite par Rabe et Salomon [4], il est surprenant qu'aucun défaut génétique n'ait été identifié avant notre étude.

L'identification du locus responsable d'une maladie génétique est pourtant capitale afin (a) de permettre un diagnostic différentiel au niveau moléculaire; (b) de proposer un diagnostic prénatal aux familles concernées; (c) d'établir une corrélation, si elle existe, entre génotype et sévérité clinique; (d) de faciliter les choix thérapeutiques et (e) de préparer le terrain pour des thérapies alternatives, en particulier, la thérapie génique.

Division de Génétique Médicale, Centre Médical Universitaire, Genève

Correspondance: Division de Génétique Médicale Centre Médical Universitaire 1, rue Michel-Servet CH-1211 Genève

Marguerite.Arbez@medecine.unige.ch



**Figure 1.** Voies intrinsèques et extrinsèques de la coagulation. Ces deux voies convergent vers une étape finale commune, la conversion du fibrinogène en fibrine, qui est la protéine principale du caillot sanguin. Le fibrinogène (appelé parfois facteur I) est la protéine déficiente chez les patients atteints d'afibrinogénémie congénitale.

## Notre recherche: une collaboration étroite entre généticiens, hématologues et patients.

Nous avons récemment étudié une famille avec quatre personnes atteintes d'afibrinogénémie congénitale (deux frères et leurs deux cousins germains). La famille est non consanguine et d'origine suisse (fig. 2). L'étude d'un marqueur génétique polymorphe situé dans l'intron 3 du gène codant pour le fibrinogène alpha (*FGA*), nous a permis de mettre en évidence la présence de délétions homozygotes chez les quatre personnes atteintes de la famille [5]. Les parents, porteurs obligatoires, étaient hétérozygotes pour la délétion. Une caractérisation plus détaillée de la famille a mis en évidence trois informations importantes et surprenantes. Premièrement, l'afibrinogénémie héréditaire dans cette famille est causée par une délétion de la majorité du gène *FGA*; cette mutation représente le premier défaut génétique décrit pour cette maladie. Deuxièmement, les quatre malades de cette famille partagent trois allèles mutés (deux différents contribués par les deux mères, un même allèle contribué par les deux pères, fig. 2) et ces trois allèles portent une délétion identique de 11 kilobases d'ADN. Seul l'exon 1 de *FGA* est présent dans l'ADN des patients (le reste du gène est délété) par contre, les deux autres gènes, *FGB* et *FGG*, codant pour les chaînes bêta et gamma sont intacts. Finalement, bien que les trois allèles portent une délétion identique, ils ont trois haplotypes distincts selon des marqueurs génétiques de part et d'autre des gènes du fibrinogène, ce qui indique des origines génétiques indépendantes et un mécanisme moléculaire précis à l'origine de ces délétions.

Cette découverte, rendue possible par la colla-

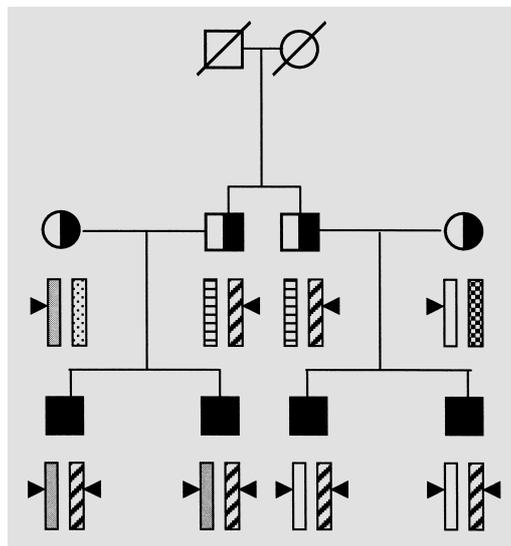
boration étroite entre chercheurs et patients a démontré que l'afibrinogénémie est due à une anomalie des gènes codant pour le fibrinogène et non pas à une dégradation excessive du fibrinogène ou un défaut dans la régulation commune de l'expression des trois gènes. Ces travaux ont ouvert la voie à de nombreuses autres recherches. En premier lieu, le mécanisme moléculaire à l'origine de cette délétion du gène *FGA* a pu être déterminé: la délétion est le résultat d'une recombinaison non-homologue entre deux séquences identiques situées l'une au début du gène *FGA*, l'autre onze kilobases plus loin dans la région intergénique entre *FGA* et *FGB* [6]. Puis, l'analyse étendue à d'autres patients (une trentaine de patients ont déjà été étudiés principalement d'origine Caucasiennne: Suisse, Française et Belge, mais aussi d'autres origines) a permis d'identifier de nombreuses autres mutations pour l'afibrinogénémie [7, 8]. En particulier, même si la délétion est relativement courante parmi les patients afibrinogénémiques (à ce jour cette même mutation a été retrouvée chez six autres patients non-apparentés), la mutation la plus fréquente est une anomalie dans l'intron 4 de *FGA*, qui se retrouve chez environ 40% des patients. Cette mutation a pour effet d'altérer l'épissage de l'ARN messager, les ARNs résultants produisant des chaînes alpha non fonctionnelles [9]. En tout, nous avons identifié quatorze mutations différentes dans le gène *FGA* et trois dans le gène *FGG*, toutes ces mutations causent une déficience de fibrinogène par une production de chaînes polypeptidiques tronquées. La conclusion la plus inattendue de ces études est que la majorité des cas d'afibrinogénémie (plus de 80%) est due à des mutations dans un seul gène: *FGA* [7] alors qu'on pourrait s'attendre à une égale implication des trois gènes. D'autres groupes ont bien mis en évidence deux mutations dans *FGB* [10] et une mutation dans *FGG* [11] mais chaque mutation n'était retrouvée que chez un seul patient.

## Applications cliniques et perspectives

Les résultats de nos recherches ont des applications cliniques immédiates puisque désormais il existe un diagnostic moléculaire précis pour l'afibrinogénémie congénitale. Le diagnostic prénatal est également possible pour les familles qui le souhaitent. L'identification au cours de la gestation d'un fœtus atteint, par exemple, permettrait de commencer un traitement substitutif de fibrinogène au moment de la naissance afin de prévenir les saignements du cordon ombilical, qui sont souvent une cause de décès.

D'autre part, l'élucidation de l'étiologie géné-

**Figure 2.** Arbre généalogique d'une famille avec plusieurs membres atteints. La transmission de la maladie se fait selon le mode autosomal récessif. Les personnes avec une afibrinogénémie sont indiquées par des symboles noirs, les personnes asymptomatiques porteuses de la délétion sont indiquées par des symboles mi-noirs, mi-blancs. Les chromosomes 4 transmis dans cette famille sont représentés par des bâtonnets de couleurs différentes: trois chromosomes distincts sont porteurs de la délétion symbolisée par un triangle noir.



tique d'une maladie est une étape préalable obligatoire pour le développement d'une thérapie génique. Cette approche n'est généralement pas considérée comme une thérapie viable pour des maladies aussi rares que l'afibrinogénémie congénitale (pour des raisons financières et parce qu'il existe déjà une thérapie d'une efficacité acceptable, bien que loin d'être parfaite). Par contre, le fait que cette maladie soit causée par des mutations dans un gène unique de petite taille (dans la majorité des cas, *FGA*, mais dans d'autres *FGG* ou *FGB*) pourrait faciliter le développement d'une thérapie génique par expression du gène normal dans les hépatocytes. Les patients atteints d'hypofibrinogénémie pourraient eux aussi bénéficier d'une telle thérapie, ce qui augmente le nombre de personnes concernées. Plusieurs vecteurs, viraux ou autres, ont déjà pu être testés pour leur efficacité à cibler le foie de façon spécifique et pour les taux d'expression du transgène. Pour l'hémophilie A par exemple, des essais cliniques de phase I, utilisant des vecteurs viraux (rétrovirus et AAV: adeno-associated virus) et non-viraux sont déjà en cours chez l'humain après que la validité de telles approches ait été confirmée dans des modèles animaux. Dans cette optique et par une coïncidence heureuse,

il existe une souris «knock-out» ayant une déficience en fibrinogène d'une sévérité et d'une présentation comparable à la maladie humaine, qui a été générée par l'interruption de l'exon 1 du gène *FGA* [12]. Cette souris représente le modèle idéal pour la mise au point d'une thérapie génique pour l'afibrinogénémie congénitale. Nos recherches futures, tout en cherchant à augmenter notre compréhension des bases moléculaires pour l'afibrinogénémie, seront dirigées vers le développement de cette approche thérapeutique qui représente un réel espoir pour les malades.

## Remerciements

Je tiens à remercier les membres des familles qui ont participé à cette recherche, ainsi que tous les médecins qui ont réuni les échantillons et les données cliniques pour chaque patient. Je remercie Dr Michael Morris, Dr Philippe de Moerloose et Prof. Stylianos Antonarakis pour leur précieuse collaboration passée et future. Cette recherche a été financée par des subsides du Fonds National Suisse (31-55848.98 et 31-59399.99) et par la Fondation Roche.

## Références

- Crabtree GR. The Molecular Biology of Fibrinogen. In: Stamatoyannopoulos S, et al. (eds). The Molecular Basis of Blood Diseases. Philadelphia: Saunders; 1983. Chapter 17.
- Martinez J. Congenital Dysfibrinogenemia. *Curr Opin Hematol* 1997; 4:357-65.
- Kant JA, Fornace AJ Jr, Saxe D, Simon MI, McBride OW, Crabtree GR. Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:2344-8.
- Rabe F, Salomon E. Über Faserstoffmangel im Blute bei einem Falle von Hämophilie. *Arch Int Med*. 1920;95:2-14.
- Neerman-Arbez M, Honsberger A, Antonarakis SE, Morris MA. Deletion of the fibrinogen alpha-chain gene (*FGA*) causes congenital afibrinogenemia. *J Clin Invest* 1999; 103:215-8.
- Neerman-Arbez M, Antonarakis SE, Honsberger A, Morris MA. The 11kb *FGA* Deletion responsible for Congenital Afibrinogenemia is mediated by a short direct repeat in the Fibrinogen Gene Cluster. *Eur J Hum Genet* 1999;7:897-902.
- Neerman-Arbez M, de Moerloose P, Bridel C, Honsberger A, Schonborner A, Rossier C et al. Mutations in the fibrinogen  $\alpha$  gene account for the majority of cases of congenital afibrinogenemia. *Blood* 2000;96:149-52.
- Neerman-Arbez M, de Moerloose P, Honsberger A, Parlier G, Arnuti B, Biron C, et al. Molecular analysis of the fibrinogen gene cluster in 16 patients with congenital afibrinogenemia: novel truncating mutations in the *FGA* and *FGG* genes. *Hum Genet* 2001; in press.
- Attanasio C, de Moerloose P, Antonarakis SE, Morris MA, Neerman-Arbez M. Activation of multiple cryptic donor splice sites by the common congenital afibrinogenemia mutation, *FGA* IVS4+1 G>T. *Blood* 2001;97:1879-81.
- Duga S, Asselta R, Santagostino E, et al. Missense mutations in the human beta fibrinogen gene cause congenital afibrinogenemia by impairing fibrinogen secretion. *Blood* 2000;95:1336-41.
- Iida H, Ishii E, Nakahara M, Urata M, Wakiyama M, Kurihara M et al. A case of congenital afibrinogenemia: fibrinogen Hakata, a novel nonsense mutation of the fibrinogen  $\gamma$ -chain gene. *Thromb Haemost* 2000;84:49-53.
- Suh TT, Holmback K, Jensen NJ, Daugherty CC, Small K, Simon DI et al. Resolution of spontaneous bleeding events but failure of pregnancy in fibrinogen-deficient mice. *Genes Dev* 1995;9:2020-33.