



HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Présentée par

Lysiane HILBERT

*Identification et expression d'anomalies moléculaires identifiées
chez des patients atteints de la maladie de Willebrand*

Soutenue le 19 décembre 2003, devant la Commission d'Examen

Président :	Jean-Claude MICHALSKI	Directeur de Recherche, INSERM, Lille 1
Directeur :	Joël MAZURIER	Directeur de Recherche, CNRS, Lille 1
Rapporteurs :	Jean-Pierre GIRMA Jenny GOUEMAND Claudine MAZURIER	Directeur de Recherche, INSERM, Bicêtre Professeur en Hématologie, Lille 2 Docteur ès Sciences, LFB, Lille
Examineur :	Jean-Pierre VILAIN	Professeur en Biologie du Développement, Lille 1

CURRICULUM VITAE

INFORMATIONS PERSONNELLES

HILBERT Lysiane née ARMBRUSTER
4 juillet 1958, Metz (Moselle)
Mariée, 2 enfants

Adresse professionnelle
LFB, UDA4
59, rue de Trévisse – BP 2006
59011 Lille cédex
Tél : 03 20 49 44 44 poste 4116
e-mail : hilbert@lfb.fr

CURSUS UNIVERSITAIRE

1977	Baccalauréat série D, Mention Bien, Metz
1978 – 1979	DEUG « Nature et Vie », Mention Assez Bien, Nancy
1980	Licence « Biologie Végétale », Mention Assez Bien, Nancy
1981	Maîtrise « Biologie des Organismes et des Populations », Mention Assez Bien, Nancy
1982	DEA « Biologie Cellulaire et Moléculaire », Mention Bien, Besançon
1983 – 1986	Thèse de Doctorat de l'Université de Nancy I, « Embryologie et Biologie de la Différenciation », Mention Très honorable avec Félicitations du Jury

FORMATIONS

2000	Personne compétente à la radioprotection
2001	Management destiné à l'encadrement intermédiaire
2002	Risques biologiques
2003	Entretien annuel d'évaluation

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

Octobre 1981 – Juin 1986 : Etudiante qualifiée en Biologie
Encadrement des travaux pratiques de 1^{ère} et 2^{ème} année du DEUG « Nature et Vie ».

Octobre 1982 – Juin 1983 : Assistante vacataire en Biologie
Encadrement des travaux pratiques de 2^{ème} année du DEUG « Psychologie ».

Octobre 1986 – Mai 1989 : Stage post-doctoral
Clonage de gènes d'extinction : Sélection et caractérisation de variants d'hépatomes humains ; construction de vecteurs à réplication autonome, dérivés du virus d'Epstein-Barr ; construction d'une banque d'expression d'ADNc de foie humain – Dr R. Bertolotti

- CGM, Gif sur Yvette (Octobre 1986 – Avril 1987) – Dr J. Beisson
- NIH, Bethesda, USA (Mai 1987 – Mai 1989) – Dr H. Okayama

Juin 1989 – Octobre 1990 : *Stage post-doctoral*

Biologie des peroxysomes des hépatomes humains et murins, *in vitro* : effets de proliférateurs peroxysomiaux sur ces cellules – Pr M. Dauça

- Faculté des Sciences, Nancy

Depuis Février 1992 : *Contrat à durée indéterminée*

Identification, expression transitoire, analyse structurale et fonctionnelle de facteur Willebrand (protéine de l'hémostase) porteur d'anomalies moléculaires responsables de défaut de liaison de ce facteur aux plaquettes ou au facteur anti-hémophilique A – Dr C. Mazurier

- Adjointe de laboratoire, Hémostase - Recherche, CRTS, Lille (Février 1992)
- Mise à la disposition du LFB (Juin 1994)
- Assistante de laboratoire, Hémostase - Recherche, CRTS, Lille (Février 1995)
- Responsable de l'Unité de Développement Analytique 4, LFB (Depuis décembre 1997)

<i>MEMBRE DE SOCIETES</i>

- Groupe d'études sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT)
- Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase (ISTH)

<i>ENCADREMENT</i>

Au cours de mon doctorat :

- Etudiants en DEUG : Travaux pratiques en Biologie Animale (1981 – 1986)
- Etudiants venant d'autres laboratoires (Nancy, Cardiff) : Formation aux techniques d'électrophorèses mono et bidimensionnelles (1986)

Au cours de mes stages post-doctoraux :

- Etudiants venant d'autres laboratoires : Formation aux techniques de biologie moléculaire (Washington ; 1988) et de culture cellulaire (Nancy, Dijon, Nice ; 1990)
- 1 étudiant en DEA « Sciences de la Vie et de la Santé » (1989)

Au cours de mon CDI :

- 3 techniciens ou techniciens supérieurs (depuis 1995)
- 1 étudiant en DEA « Sciences de la Vie et de la Santé » (1998)
- 2 étudiants d'IUT « Génie Biologique » (1999, 2003)
- 2 CDD (2001)
- Etudiants venant d'autres laboratoires : Formation aux techniques de biologie moléculaire et de culture cellulaire (Londres ; 1996)

Recherches effectuées dans le cadre de la thèse d'Université ou de stages post-doctoraux

1 – **Armbruster L**, Levy M, Mathieu MN, Bautz AM. Acid phosphatase activity in hemolymph, hemocytes, fat body and salivary glands during larval and prepupal development in *Calliphora erythrocephala* (Diptera-Calliphoridae). *Comp Biochem Physiol* 84B: 348-54, **1986**.

2 – **Armbruster L**, Dauça M, Bautz AM. Stage-specific polypeptides in *Calliphora erythrocephala* hemocytes during metamorphosis. *Comp Biochem Physiol* 92B: 763-72, **1989**.

3 – Lutfalla G, **Armbruster L**, Dequin S, Bertolotti R. Construction of an EBNA-producing line of well differentiated human hepatoma cells and of appropriate EBV-based shuttle vectors. *Gene* 76, 1: 27-39, **1989**.

4 – **Armbruster L**, Cavard C, Briand P, Bertolotti R. Selection of variant hepatoma cells in liver-specific growth media: regulation at the mRNA level. *Differentiation* 50: 25-33, **1992**.

5 – Keller JM, Cable S, El Bouthoury F, Heusser S, Scotto C, **Armbruster L**, Ciolek E, Colin S, Schilt J, Dauça M. Peroxisome through cell differentiation and neoplasia. *Biol Cell* 77: 77-88, **1993**.

Recherches effectuées dans le cadre professionnel : Identification, expression transitoire, analyse structurale et fonctionnelle de facteur Willebrand porteur d'anomalies moléculaires

6 – **Hilbert L**, Gaucher C, de Romeuf C, Horellou MH, Vink T, Mazurier C. Leu 697→Val mutation in mature von Willebrand factor is responsible for type IIB von Willebrand disease. *Blood* 83: 1542-50, **1994**.

7 – **Hilbert L**, Gaucher C, Mazurier C. Effects of different amino-acid substitutions in the leucine 694 - proline 708 segment of recombinant von Willebrand factor. *Br J Haematol* 91: 983-90, **1995**.

8 – **Hilbert L**, Gaucher C, Mazurier C. Identification of two mutations (Arg611Cys and Arg611His) in the A1 loop of von Willebrand factor (vWF) responsible for type 2 von Willebrand disease with decreased platelet-dependent function of vWF. *Blood* 86: 1010-18, **1995**.

9 – Meyer D, Fressinaud E, Gaucher C, Lavergne JM, **Hilbert L**, Ribba AS, Jorieux S, Mazurier C and the INSERM network on molecular abnormalities in VWD. Gene defects in 150 unrelated French cases with type 2 von Willebrand disease: from the patient to the gene. *Thromb Haemost* 78: 451-6, **1997**.

10 – De Romeuf C, **Hilbert L**, Mazurier C. Platelet activation and aggregation induced by recombinant von Willebrand factors reproducing four type 2B von Willebrand disease missense mutations. *Thromb Haemost* 79: 211-6, **1998**.

11 – **Hilbert L**, Gaucher C, Abgrall JF, Parquet A, Trzeciak C, Mazurier C. Identification of new type 2B von Willebrand disease mutations : Arg543Gln, Arg545Pro and Arg578Leu. *Br J Haematol* 103: 877-84, **1998**.

12 – **Hilbert L**, Jenkins PV, Gaucher C, Meriane F, Collins PW, Pasi KJ, Mazurier C. Type 2M vWD resulting from a lysine deletion within a four lysine residue repeat in the A1 loop of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 84: 188-94, **2000**.

13 – Ribba AS, **Hilbert L**, Lavergne JM, Fressinaud E, Boyer-Neumann C, Ternisien C, Juhan-Vague I, Goudemand J, Girma JP, Mazurier C, Meyer D. The Arg552Cys mutation within the A1 loop of von Willebrand factor (vWF) induces an abnormal folding with a loss-of-function resulting in a 2A-like phenotype. Study of ten patients and of mutated recombinant vWF. *Blood* 97: 952-9, **2001**.

14 – 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 Practice & Research Clinical Haematology* 14, 2: 337-47, **2001**.

15 – Meyer D, Fressinaud E, **Hilbert L**, Ribba AS, Lavergne JM, Mazurier C. Type 2 von Willebrand disease causing defective von Willebrand factor-dependent platelet function. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 14, 2: 349-64, **2001**.

16 – Goodeve AC, Eikenboom JCJ, Ginsburg D, **Hilbert L**, Mazurier C, Peake IR, Sadler JE, Rodeghiero F. A Standard Nomenclature for von Willebrand Factor Gene Mutations and Polymorphisms On behalf of the ISTH SSC Subcommittee on von Willebrand Factor. *Thromb Haemost* 85: 929-31, **2001**.

17 – **Hilbert L**, Fressinaud E, Ribba AS, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. Identification of a new type 2M von Willebrand disease mutation also at position 1324 of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 87: 635-40, **2002**.

18 – **Hilbert L**, Jorieux S, Proulle V, Favier R, Goudemand J, Parquet A, Meyer D, Fressinaud E, Mazurier C and the INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. Two novel mutations, Q1053H and C1060R, located in the D3 domain of von Willebrand factor are responsible for decreased FVIII binding capacity. *Br J Haematol* 120 : 627-632, **2003**.

19 – Federici AB, Mazurier C, Berntorp E, Lee CA, Scharrer I, Goudemand J, Lethagen S, Nitu I, Ludwig G, **Hilbert L**, Mannucci PM. Response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease. Results of a multicenter European study. **Soumis à Blood**.

20 – **Hilbert L**, Jorieux S, Lavergne JM, Fontenay-Roupie M, Ruan C, Boinot C, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. Importance of exon 18 of von Willebrand factor gene in VWF capacity to bind FVIII. **A soumettre à Journal of Thrombosis and Haemostasis**.

- **Hilbert L**, Gaucher C, de Romeuf C, Vink T, Mazurier C. Expression de facteur Willebrand recombinants mutés. Groupe d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose Paris, **1993** (OC)
- Gaucher C, **Hilbert L**, de Romeuf C, Vink T, Mazurier C. Two new mutations (F751C and L697V) of von Willebrand factor are responsible for subtype IIA and IIB of von Willebrand disease respectively. ISTH New York. Thromb Haemost 69, 6, **1993** (OC)
- Jorieux S, Hilbert L, Mazurier C. The use of site-directed mutagenesis of von Willebrand factor to elucidate the mechanism of its interaction with factor VIII. ISTH New York Thromb Haemost 69, 558, **1993** (OC)
- **Hilbert L**, Gaucher C, de Romeuf C, Mazurier C. Importance de la séquence aa 694-708 du facteur Willebrand mature dans le mécanisme physiologique de son interaction avec la glycoprotéine Ib plaquettaire. Société Française d'Hématologie, Paris, **1994** (poster)
- Gaucher C, **Hilbert L**, Mazurier C. Characterization of von Willebrand factor gene defects in two unrelated patients with type IIC von Willebrand disease. European Haematology Association Bruxelles, **1994** (OC)
- De Romeuf C, **Hilbert L**, Mazurier C. Comparison of three type IIB recombinant von Willebrand factors in their interaction with platelets. European Haematology Association Bruxelles, **1994** (OC)
- Gaucher C, **Hilbert L**, Meriane F, Mazurier C, Pernod G. Type 2 von Willebrand disease resulting from an insertion or deletion in the 509-695 disulphide loop of von Willebrand factor. ISTH Jérusalem **1995** (poster)
- **Hilbert L**, Gaucher C, de Romeuf C, Parquet A, Abgrall J-F, Trzeciak C, Mazurier C. Identification of "new" type 2B von Willebrand disease mutations: R543Q, R545P and R578L. European Haematology Association Paris, **1996** (OC)
- **Hilbert L**, Gaucher C, Sié P, Mazurier C. Expression of type 2A von Willebrand disease mutations. Identification of a new mutation: L817P. European Haematology Association Paris, **1996** (poster)
- **Hilbert L**, Gaucher C, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in vWD. A new type 2M ("Type B") vWD mutation (G1324A) also at position 561 of the mature vWF subunit. ISTH Florence **1997** (poster)
- **Hilbert L**, Degallaix F, Jorieux S, Gaucher C, Proulle V, Meyer D, Mazurier C et le réseau INSERM sur les anomalies moléculaires de la maladie de Willebrand (vWD). Identification d'une nouvelle mutation (Gln290His) VWD. GEHT & GRRC **1998** (poster)
- Ribba AS, **Hilbert L**, Lavergne JM, Loisel I, Mazurier C, Meyer D. Quatre mutations, Leu513Pro, Glu596Lys, Ile662Phe et Cys695Tyr du facteur Willebrand sont responsables d'une diminution de liaison à la glycoprotéine Ib plaquettaire. GEHT & GRRC **1998** (OC)
- **Hilbert L**, Jorieux S, Degallaix F, Proulle V, Dreyfus M, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification of a new type 2N von Willebrand disease mutation (Gln290His) in the D3 domain of von Willebrand factor. ISTH Paris, Thromb Haemost **1999**, Aug suppl, p 282, 883 (poster)
- **Hilbert L**, Ruan C, Jorieux S, Fontenay-Roupie M, Stieltjes N, Lavergne JM, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification of two closely located new type 2N von Willebrand disease mutations (Tyr32Cys and Met37Val). ISTH Paris, Thromb Haemost **1999**, Aug suppl, p 281, 882 (poster)
- Ribba AS, **Hilbert L**, Lavergne JM, Fressinaud E, Mazurier C, Meyer D and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Mutations at positions 513, 552, 611 and 695 in the A1 loop of von Willebrand factor induce a type 2A phenotype. Usefulness of botrocetin to distinguish type 2A and 2M von Willebrand disease. ISTH Paris, Thromb Haemost **1999**, Aug suppl, p 510, 1603 (OC)

- Lavergne JM, Fressinaud E, **Hilbert L**, Ribba AS, Proulle V, Pommereuil M, Juhan-Vague I, Mazurier C, Meyer D and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification in type 2M von Willebrand disease of 5 new candidate mutations in the N-terminal part of the A1 loop of von Willebrand factor. ISTH Paris, *Thromb Haemost* **1999**, Aug suppl, p 283, 888 (poster)
- Mazurier C, Caron C, **Hilbert L**, Jorieux S, Gaucher C, Goudemand J, Fressinaud E, Meyer D and the INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand disease. Type 2N von Willebrand disease – 10 years of diagnostic experience in France. XXIV International Congress of the World Federation of Hemophilia, Montreal Haemophilia **2000**, 6, p 212 (OC)
- Meyer D, Fressinaud E, Lavergne JM, Ribba AS, **Hilbert L**, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Molecular analysis of type 2 von Willebrand disease in France: study of 263 unrelated patients and of 68 distinct mutations. ISTH Paris **2001** (OC)
- Mazurier C, **Hilbert L**, Caron C, Fressinaud E, Goudemand J, Meyer D and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Type 2N von Willebrand disease – phenotypic and genotypic diagnosis experience in France. ISTH Paris, **2001** (OC)
- Federici AB, Berntorp E, Lee CA, Scharrer I, Goudemand J, Lethagen S, Nitu I, Ludwig G, **Hilbert L**, Mazurier C, Mannucci PM on behalf of Biomed 2 European Project on Optimizing Orphan Drug Therapy in Severe Forms of VWD. Biological response of desmopressin and von Willebrand factor gene defects in severe type 1 and 2 von Willebrand disease: results of a multicenter European study. ISTH Paris, **2001** (OC)
- Veyradier A, Dakik O, Lavergne JM, Ribba AS, Girma JP, **Hilbert L**, Mazurier C, Fressinaud E, Meyer D and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Von Willebrand disease "Vicenza" with mutation R1205H of von Willebrand factor (VWF) : study of 18 french patients and of recombinant VWF. ISTH Paris, **2001** (poster)
- **Hilbert L**, Boinot C, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification of a new type 2N VWD mutation (C804F) in exon 18 of the von Willebrand factor gene. ISTH Paris, **2001** (poster)
- **Hilbert L**, Nitu-Whalley I, Duchemin J, Lavergne JM, Jenkins V, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification of two mutations at the same position (V1279I and V1279F) responsible for distinct characteristics of recombinant von Willebrand factor. ISTH Paris, **2001** (poster)
- **Hilbert L**, Lavergne JM, Ternisien C, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Expression of a new type 2A VWD missense mutation, V1604F (Val841Phe) in the von Willebrand factor gene. ISTH Paris, **2001** (poster)
- Lavergne JM, Fressinaud E, Goudemand J, Horellou MH, Ribba AS, **Hilbert L**, Mazurier C, Meyer D and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification of 5 new cysteine mutations in the D3 domain of von Willebrand factor inducing type 2M von Willebrand disease. ISTH Paris, **2001** (poster)
- Mazurier C, **Hilbert L**, Caron C, Fressinaud E, Goudemand J, Meyer D et le réseau INSERM sur les anomalies moléculaires dans la maladie de Willebrand. Bilan du diagnostic phénotypique et génotypique de la maladie de Willebrand de type 2N en France. Société Française d'Hématologie Paris, *Hématologie* **2001**, vol 7, Abs 238 p 143 (poster)
- **Hilbert L**, Messenger SL, Ribba AS, Mazurier C, Schneppenheim R, Goodeve AC, Castaman G, Federici AB, Battle J, Eikenboom JJ, Ingerslev J, Habart D, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Peake I. In vitro expression of 4 novel mutations identified in type 1 von Willebrand disease. ISTH Birmingham, **2003** (OC)

- **Hilbert L**, D'Oiron R, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification and expression of the first type 2N von Willebrand disease mutation (E1078K) located in exon 25 of von Willebrand factor gene. ISTH Birmingham, **2003** (poster)
- **Hilbert L**, Nurden P, Caron C, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Type 2N von Willebrand disease due to compound heterozygosity for the frequent R854Q type 2N mutation and a new R763G mutation abolishing the cleavage of von Willebrand factor propeptide. ISTH Birmingham, **2003** (poster)
- **Hilbert L**, Federici AB, Baronciani L, Mazurier C. Expression of a new candidate mutation, G1629R, identified in an Italian patient with type 2A von Willebrand disease. ISTH Birmingham, **2003** (poster)
- Tout H, Houllier A, Obert B, Ribba AS, **Hilbert L**, Mazurier C, Meyer D, Girma JP. Stability of 19 mutated recombinant von Willebrand factor to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). ISTH Birmingham, **2003** (poster)

	Page
▪ ABREVIATIONS	5
▪ REMERCIEMENTS	6
▪ AVANT-PROPOS	7
▪ LISTE DES TRAVAUX SUR LE FACTEUR WILLEBRAND ET LA MALADIE DE WILLEBRAND	9
▪ INTRODUCTION GENERALE	13
I – LE FACTEUR WILLEBRAND	14
A – Biosynthèse et structure	14
1 – Biosynthèse	
2 – Stockage et sécrétion	
3 – Structure primaire	
B – Fonctions et rôles dans l'hémostase	16
1 – Rôle dans l'hémostase primaire	
2 – Rôle dans la coagulation	
II – LA MALADIE DE WILLEBRAND	17
A – Classification	17
1 – Le type 1	
2 – Le type 2	
3 – Le type 3	
B – Manifestations cliniques	18
C – Origine	19
D – Diagnostic biologique	19
1 – Examens de routine	
2 – Examens spécialisés	
E – Traitement	22
1 – La desmopressine	
2 – Traitement substitutif	
III – PRESENTATION DE CE TRAVAIL	24

<p>PREMIERE PARTIE : Etude d'anomalies moléculaires responsables de défauts de liaison du VWF à la glycoprotéine Ib plaquettaire</p>

▪ **INTRODUCTION**

I – LIAISON VWF-PLAQUETTES	25
A – Liaison aux récepteurs plaquettaires	25
B – Mesure de l'interaction VWF/GPIb	26
C – Intervention du domaine A1 du VWF dans l'interaction VWF/GPIb	27
II – RELATION PHENOTYPE – GENOTYPE CHEZ LES PATIENTS PRESENTANT DES DEFAUTS DE LIAISON DE LEUR VWF A LA GPIb PLAQUETTAIRE	28
A – Construction de vecteur d'expression muté	29
B – Expression de VWF recombinant muté	29

- **CHAPITRE I : Identification et expression d'anomalies moléculaires de type 2B VWD**

RAPPEL	30
A – Caractérisation du phénotype du patient	30
B – Caractérisation du génotype du patient	31
C – Etude de VWF recombinants mutés	31
D – Conclusion	31

PUBLICATION N° 1 : *Hilbert L, Gaucher C, Mazurier C. Effects of different amino-acid substitutions in the leucine 694-proline 708 segment of recombinant von Willebrand factor. Br J Haematol 1995, 91: 983-990*

- **CHAPITRE II : Identification et expression d'anomalies moléculaires de type 2A VWD ou de type 2 indéterminé**

RAPPEL	32
A – Caractérisation du phénotype des patients	33
B – Caractérisation du génotype des patients	33
C – Etude de VWF recombinants mutés	33
D – Conclusion	34

PUBLICATION N° 2 : *Hilbert L, Gaucher C, Mazurier C. Identification of two mutations (Arg611Cys and Arg611His) in the A1 loop of von Willebrand factor (vWF) responsible for type 2 von Willebrand disease with decreased platelet-dependent function of VWF. Blood 1995, 86: 1010-1018*

- **CHAPITRE III : Identification et expression d'anomalies moléculaires de type 2M VWD**

RAPPEL	35
A – Caractérisation du phénotype des patients	35
B – Caractérisation du génotype des patients	36
C – Etude du VWF recombinant muté	36
D – Conclusion	36

PUBLICATION N° 3 : *Hilbert L, Fressinaud E, Ribba A-S, Meyer D, Mazurier C and the INSERM network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification of a new type 2M von Willebrand disease mutation also at position 1324 of von Willebrand factor. Thromb Haemost 2002, 87: 635-640*

- **CONCLUSION SUR LES MUTATIONS DE TYPE 2, LOCALISEES DANS LE DOMAINE A1 DU VWF ET INDUISANT UN DEFAUT DE LIAISON DU VWF A LA GPIb PLAQUETTAIRE**

SECONDE PARTIE : Etude d'anomalies moléculaires responsables de défauts de liaison du VWF au FVIII

	Page
▪ INTRODUCTION	39
I – LE FACTEUR VIII	39
A – Biosynthèse et structure	39
B – Fonctions et rôles	40
II – HEMOPHILIE A	40
A – Classification	40
B – Manifestations cliniques et diagnostic biologique	40
C – Génétique de l'hémophilie A	41
III – LE COMPLEXE FVIII/VWF	41
IV – LA MALADIE DE WILLEBRAND DE TYPE 2N	42
A – Introduction	42
B – Génétique de la maladie de Willebrand de type 2N	42
▪ CHAPITRE I : Identification et expression d'anomalies moléculaires de type 2N VWD localisées dans le domaine D' du VWF	
RAPPEL	44
A – Caractérisation du phénotype des patients	44
B – Caractérisation du génotype des patients	44
C – Etude de VWF recombinants mutés	45
D – Conclusion	45
PUBLICATION N° 4 : <i>Hilbert L, Jorieux S, Lavergne J-M, Fontenay-Roupie M, Ruan C, Boinot C, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C. Importance of exon 18 of von Willebrand factor gene in its capacity to bind factor VIII. Pour soumission.</i>	47-60
▪ CHAPITRE II : Identification et expression d'anomalies moléculaires de type 2N VWD localisées dans le domaine D3 du VWF	
RAPPEL	61
A – Caractérisation du phénotype des patients	61
B – Caractérisation du génotype des patients	61
C – Etude de VWF recombinants mutés	62
D – Conclusion	62
PUBLICATION N° 5 : <i>Hilbert L, Jorieux S, Proulle V, Favier R, Goudemand J, Parquet A, Meyer D, Fressinaud E, Mazurier C. Two novel mutations, Q1053H and C1060R, located in the D3 domain of von Willebrand factor, are responsible for decreased FVIII-binding capacity. Br J Haematol 2003, 120: 627-632</i>	
▪ CONCLUSION SUR LES MUTATIONS DE TYPE 2 INDUISANT UN DEFAUT DE LIAISON DU VWF AU FVIII	63

CONCLUSION

65-67

REFERENCES

68-76

ABREVIATIONS

aa	:	Acide aminé
Acm	:	Anticorps monoclonal
ADN	:	Acide DéoxyriboNucléique
ADNc	:	Acide DéoxyriboNucléique complémentaire
ADP	:	Adénosine DiPhosphate
ARNm	:	Acide RiboNucléique messenger
BPM	:	Bas Poids Moléculaire
Da	:	Dalton
dDAVP	:	1-déamino-8-D-Arginine VasoPressine
DGGE	:	Denaturing Gel Gradient Electrophoresis
ELISA	:	Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay (dosage immunoenzymatique)
FVIII	:	Facteur VIII ou anti-hémophilique A
FVIIIa	:	Facteur VIII activé
FVIII:Ag	:	Antigène du FVIII
FVIII:C	:	Activité pro-coagulante du FVIII
FX	:	Facteur X
FXa	:	Facteur X activé
GPIb	:	Glycoprotéine Ib
GPIIb/IIIa	:	Glycoprotéines IIb /IIIa
HPM	:	Haut Poids Moléculaire
IPM	:	Poids Moléculaire Intermédiaire
ISTH	:	Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase
kDa	:	Kilodalton
MIDAS	:	Metal Ion Dependent Adhesion Site
pb	:	Paire de base
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PPP	:	Plasma Pauvre en Plaquettes
PRP	:	Plasma Riche en Plaquettes
PM	:	Poids Moléculaire
PTT	:	Purpura Thrombotique Thrombopénique
RIPA	:	Agrégation des Plaquettes Induite par la Ristocétine
SDS	:	Dodécyl Sulfate de Sodium
SSC	:	Comité Scientifique et de Standardisation
TS	:	Temps de Saignement
UI	:	Unité Internationale
VWF	:	Facteur Willebrand
VWF:Ag	:	Antigène du facteur Willebrand
VWF:CB	:	Liaison du facteur Willebrand au collagène
VWF/GPIb	:	Liaison du facteur Willebrand à la glycoprotéine Ib plaquettaire
VWF:RCo	:	Activité cofacteur de la ristocétine du facteur Willebrand
VWFr	:	Facteur Willebrand recombinant
VWD	:	Maladie de Willebrand
WT	:	Wild Type ou sauvage

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord à Madame le Docteur Claudine MAZURIER, qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a fait découvrir un thème de recherche passionnant et diversifié. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a témoignée en me déléguant la responsabilité de divers projets sur la maladie de Willebrand. Je tiens également à lui exprimer mon admiration pour ses compétences dans les divers domaines de l'hémostase et de la coagulation, et ma profonde gratitude pour sa disponibilité et nos discussions enrichissantes. Qu'elle trouve ici l'assurance de toute mon affection.

Je remercie vivement les directions du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille et du Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies qui m'ont permis de mener mes travaux dans d'excellentes conditions.

Je suis reconnaissante à Messieurs les Docteurs Joël MAZURIER et Jean-Claude MICHALSKI d'avoir accepté de m'inscrire dans leur structure pour me permettre de soutenir cette habilitation à diriger des recherches. J'espère que ce mémoire sera digne de la confiance qu'ils m'ont témoignée.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Madame le Professeur Jenny GOUEMAND, qui malgré ses nombreuses charges, a accepté d'être rapporteur de ce travail. J'en profite pour la remercier des collaborations efficaces et fructueuses que nous avons établies ces dernières années.

Je remercie sincèrement Monsieur le Docteur Jean-Pierre GIRMA pour sa présence dans ce jury et pour son aide précieuse dans la réalisation de figures concernant la structure tridimensionnelle du domaine A1 du VWF. J'ai toujours apprécié sa gentillesse et ses conseils lors de nos rencontres à l'INSERM ou lors de congrès.

Je suis également particulièrement reconnaissante à Monsieur le Professeur Jean-Pierre VILAIN d'avoir accepté d'être membre de ce jury et d'avoir témoigné un vif intérêt pour le travail présenté dans ce mémoire.

Mes remerciements vont aussi, bien évidemment, à mes collaborateurs (dont certains sont maintenant dispersés dans d'autres structures) pour leur contribution à la réussite de ce travail. Leur participation et leur amitié ont été très importants tout au long de ces années.

A Jean-Louis, Pierre et Hélène, pour leur amour qui me permet de concilier ma vie professionnelle à une vie familiale équilibrée.

A mes parents.

AVANT PROPOS

Recrutée en 1991 par le Centre Régional de Transfusion Sanguine (CRTS) de Lille, j'ai été chargée d'y implanter, au sein du Laboratoire de Recherche sur l'Hémostase (LRH) dirigé par le Dr Claudine MAZURIER, une activité de culture cellulaire lui permettant d'élargir son champ d'investigation et sa compétitivité internationale. Mon activité de recherche a été centrée sur l'étude du gène du **facteur Willebrand (VWF)**, glycoprotéine plasmatique essentielle à l'hémostase primaire et à la coagulation, dont l'étude des relations structure-fonction constituait l'axe principal de recherche de ce laboratoire. Mes travaux au sein de ce laboratoire ont contribué à l'étude de 2 formes particulières de la **maladie de Willebrand (VWD)** affectant des patients présentant des anomalies de liaison de leur VWF plasmatique aux plaquettes (VWD de types 2A et 2B).

Suite à la réforme des centres français de transfusion sanguine, le LRH a été officiellement rattaché, en décembre 1997, au département pré-clinique (DPC) du Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB). Ce laboratoire pharmaceutique emploie actuellement plus de 1100 salariés sur ses 2 sites industriels de production, à Lille et aux Ulis. A partir du plasma préparé grâce aux dons de sang, le LFB fractionne des protéines qui permettent de produire des médicaments. On estime à près de 500 000 le nombre annuel de patients traités, en France, par un des douze médicaments du LFB. Une approche biotechnologique est également développée dans son département Recherche.

J'ai, au sein de la DPC de Lille, la responsabilité d'une petite unité de Développement Analytique (UDA4) dont la mission est la poursuite des travaux et collaborations liés à la recherche « fondamentale » sur les anomalies du gène du VWF.

La majeure partie de mon activité au LFB a été réalisée dans le cadre d'un **réseau de recherche clinique de l'INSERM** intitulé « Caractérisation des anomalies du facteur Willebrand dans la maladie de Willebrand » créé en juillet 1996, pour une durée de 4 ans. Ce Réseau, qui regroupait à sa création 27 centres permet après acceptation des demandes d'inclusion sur la base des données phénotypiques des patients, une confirmation du phénotype et une recherche génotypique. Compte tenu du nombre croissant des demandes d'inclusion et de la participation d'autres centres investigateurs, ce réseau a été prolongé de 3 ans et s'est donc arrêté officiellement en juillet 2003.

Ce réseau INSERM avait pour objectifs, sur un plan à la fois fondamental et appliqué :

- Identification des anomalies du gène du VWF responsables des différentes formes de la VWD permettant de mieux comprendre les relations structure/fonction de cette protéine complexe et multifonctionnelle.
- Amélioration à un niveau national du diagnostic et de la classification des patients atteints de la VWD permettant une optimisation de la thérapeutique.

L'identification des anomalies moléculaires des patients inclus dans ce Réseau a été répartie sur 2 centres : l'hôpital du Kremlin-Bicêtre (INSERM U143), dirigé par le Professeur Dominique MEYER, pour les patients présentant des anomalies de liaison de leur VWF aux plaquettes et l'UDA4 (LFB de Lille), pour les patients présentant des anomalies de liaison de leur VWF au facteur anti-hémophilique A (FVIII). Les anomalies de cette liaison ont été étudiées depuis 1998 dans le laboratoire d'Hématologie B du Centre Hospitalier Régional de Lille, dirigé par le Professeur Jenny GOUDEMANT.

Identification de l'anomalie moléculaire responsable du phénotype

- **Extraction** ADN génomique (sang)
- Amplification par **PCR** des exons concernés
- **Séquençage** des exons

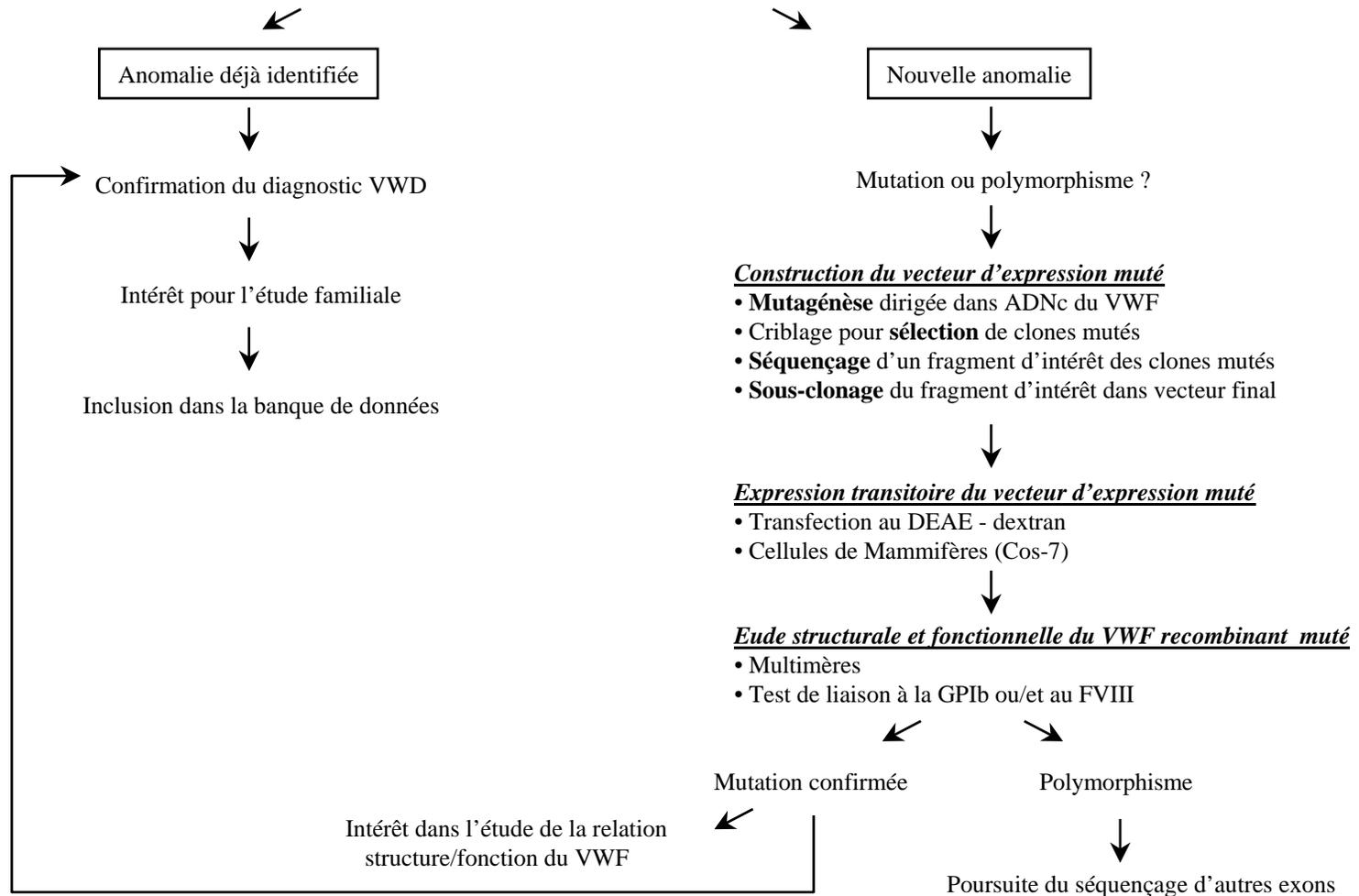


Figure 1 : Stratégie suivie pour l'étude de la maladie de Willebrand de type 2.

L'identification de l'anomalie moléculaire responsable du phénotype anormal du patient se fait par séquençage du gène du VWF. L'analyse des caractéristiques du VWF recombinant porteur de l'anomalie moléculaire identifiée permet de confirmer la relation entre le phénotype et le génotype du patient.

En parallèle à cette activité liée au Réseau INSERM, mon unité est impliquée dans des **programmes européens** permettant une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la VWD. Le programme européen « Optimisation de la thérapeutique par un médicament orphelin, des formes sévères de la maladie de Willebrand » (1997-2001) a permis en particulier d'évaluer si la nature de l'anomalie moléculaire identifiée chez le patient influence sa réponse à un traitement spécifique à la desmopressine. Le second programme (2000-2003) porte sur « le diagnostic clinique et moléculaire de la maladie de Willebrand de type 1 ». Dans ce dernier programme, je suis chargée de l'expression de nouvelles anomalies moléculaires qui ont été identifiées chez des patients présentant des anomalies quantitatives modérées du VWF.

Les travaux que j'ai menés jusqu'à présent se sont ainsi focalisés

- d'une part, sur l'identification d'anomalies moléculaires du gène du VWF à l'origine de différentes formes de la VWD
- et d'autre part, sur l'expression *in vitro*, dans des cellules eucaryotes, de VWF recombinant (VWFr) porteur de ces mêmes anomalies.

La stratégie de recherche de mes travaux (**Figure 1**) repose sur l'amplification par Polymerase Chain Reaction (**PCR**) de certains exons du gène du VWF et sur leur **séquençage** (après **extraction** de l'ADN génomique à partir de quelques millilitres de sang).

L'identification d'anomalies nucléotidiques déjà répertoriées permet de confirmer le diagnostic de VWD. A l'opposé, lorsqu'une nouvelle anomalie nucléotidique est identifiée, il faut vérifier qu'il s'agit bien d'une mutation responsable du phénotype du patient et non d'un polymorphisme rare. Pour cela, les nouvelles mutations candidates correspondant aux changements nucléotidiques identifiés sont introduites par **mutagenèse dirigée**, dans un vecteur d'expression contenant l'acide déoxyribonucléique complémentaire (ADNc) complet du VWF humain. Après **expression transitoire** dans des cellules de Mammifères (Cos-7), l'étude des **caractéristiques structurales et fonctionnelles** du VWFr muté sécrété permet de confirmer que l'anomalie moléculaire identifiée par séquençage est bien responsable du phénotype du patient. Ces résultats permettent alors de poser le diagnostic correct et facilitent l'étude familiale.

Cette double approche de détection et d'expression d'anomalies moléculaires du gène du VWF a été initialement mise en œuvre pour compléter l'étude biologique de la VWD et pour préciser le diagnostic, notamment pour les formes complexes de cette maladie. Outre cette finalité diagnostique, l'expression de VWFr fournit un modèle d'étude physiologique isolé et simplifié permettant l'analyse des relations structure-fonction particulièrement complexes du VWF.

L'ensemble de mes travaux sur le VWF et la VWD a fait l'objet de 15 publications (dont 5 sont présentées dans ce mémoire), 13 communications orales et 18 posters (voir liste p 9–12).

J'ai la responsabilité depuis 1995 de 2 techniciens et j'ai encadré, dans le cadre de ces recherches, 1 étudiant en DEA et 2 étudiants en IUT « Génie Biologique ».

LISTE DES TRAVAUX SUR LE FACTEUR WILLEBRAND ET LA MALADIE DE WILLEBRAND

PUBLICATIONS

1 – **Hilbert L**, Gaucher C, de Romeuf C, Horellou MH, Vink T, Mazurier C. Leu 697→Val mutation in mature von Willebrand factor is responsible for type IIB von Willebrand disease. *Blood* 83: 1542-50, **1994**.

2 – **Hilbert L**, Gaucher C, Mazurier C. Effects of different amino-acid substitutions in the leucine 694 - proline 708 segment of recombinant von Willebrand factor. *Br J Haematol* 91: 983-90, **1995**.

3 – **Hilbert L**, Gaucher C, Mazurier C. Identification of two mutations (Arg611Cys and Arg611His) in the A1 loop of von Willebrand factor (vWF) responsible for type 2 von Willebrand disease with decreased platelet-dependent function of vWF. *Blood* 86: 1010-8, **1995**.

4 – Meyer D, Fressinaud E, Gaucher C, Lavergne JM, **Hilbert L**, Ribba AS, Jorieux S, Mazurier C and the INSERM network on molecular abnormalities in VWD. Gene defects in 150 unrelated French cases with type 2 von Willebrand disease: from the patient to the gene. *Thromb Haemost* 78: 451-6, **1997**.

5 – De Romeuf C, **Hilbert L**, Mazurier C. Platelet activation and aggregation induced by recombinant von Willebrand factors reproducing four type 2B von Willebrand disease missense mutations. *Thromb Haemost* 79: 211-6, **1998**.

6 – **Hilbert L**, Gaucher C, Abgrall JF, Parquet A, Trzeciak C, Mazurier C. Identification of new type 2B von Willebrand disease mutations : Arg543Gln, Arg545Pro and Arg578Leu. *Br J Haematol* 103: 877-84, **1998**.

7 – **Hilbert L**, Jenkins PV, Gaucher C, Meriane F, Collins PW, Pasi KJ, Mazurier C. Type 2M vWD resulting from a lysine deletion within a four lysine residue repeat in the A1 loop of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 84: 188-94, **2000**.

8 – Ribba AS, **Hilbert L**, Lavergne JM, Fressinaud E, Boyer-Neumann C, Ternisien C, Juhan-Vague I, Goudemand J, Girma JP, Mazurier C, Meyer D. The Arg552Cys mutation within the A1 loop of von Willebrand factor (vWF) induces an abnormal folding with a loss-of-function resulting in a 2A-like phenotype. Study of ten patients and of mutated recombinant vWF. *Blood* 97: 952-9, **2001**.

9 – 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 Practice & Research Clinical Haematology* 14, 2: 337-47, **2001**.

10 – Meyer D, Fressinaud E, **Hilbert L**, Ribba AS, Lavergne JM, Mazurier C. Type 2 von Willebrand disease causing defective von Willebrand factor-dependent platelet function. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 14, 2: 349-64, **2001**.

11 – Goodeve AC, Eikenboom JCJ, Ginsburg D, **Hilbert L**, Mazurier C, Peake IR, Sadler JE, Rodeghiero F. A Standard Nomenclature for von Willebrand Factor Gene Mutations and Polymorphisms On behalf of the ISTH SSC Subcommitee on von Willebrand Factor. *Thromb Haemost* 85: 929-31, **2001**.

12 – **Hilbert L**, Fressinaud E, Ribba AS, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. Identification of a new type 2M von Willebrand disease mutation also at position 1324 of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 87: 635-40, **2002**.

13 – **Hilbert L**, Jorieux S, Proulle V, Favier R, Goudemand J, Parquet A, Meyer D, Fressinaud E, Mazurier C and the INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. Two novel mutations, Q1053H and C1060R, located in the D3 domain of von Willebrand factor are responsible for decreased FVIII binding capacity. *Br J Haematol* 120 : 627-632, **2003**.

14 – Federici AB, Mazurier C, Berntorp E, Lee CA, Scharrer I, Goudemand J, Lethagen S, Nitu I, Ludwig G, **Hilbert L**, Mannucci PM. Response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease. Results of a multicenter European study. **Soumis à Blood**.

15 – **Hilbert L**, Jorieux S, Lavergne JM, Fontenay-Roupie M, Ruan C, Boinot C, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. Importance of exon 18 of von Willebrand factor gene in VWF capacity to bind FVIII. **A soumettre à Journal of Thrombosis and Haemostasis**.

COMMUNICATIONS AU COURS DE CONGRES

- **Hilbert L**, Gaucher C, de Romeuf C, Vink T, Mazurier C. Expression de facteur Willebrand recombinants mutés. Groupe d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose Paris, **1993** (OC)
- Gaucher C, **Hilbert L**, de Romeuf C, Vink T, Mazurier C. Two new mutations (F751C and L697V) of von Willebrand factor are responsible for subtype IIA and IIB of von Willebrand disease respectively. ISTH New York. *Thromb Haemost* 69, 6, **1993** (OC)
- Jorieux S, Hilbert L, Mazurier C. The use of site-directed mutagenesis of von Willebrand factor to elucidate the mechanism of its interaction with factor VIII. ISTH New York *Thromb Haemost* 69, 558, **1993** (OC)
- **Hilbert L**, Gaucher C, de Romeuf C, Mazurier C. Importance de la séquence aa 694-708 du facteur Willebrand mature dans le mécanisme physiologique de son interaction avec la glycoprotéine Ib plaquettaire. Société Française d'Hématologie, Paris, **1994** (poster)
- Gaucher C, **Hilbert L**, Mazurier C. Characterization of von Willebrand factor gene defects in two unrelated patients with type IIC von Willebrand disease. European Haematology Association Bruxelles, **1994** (OC)
- De Romeuf C, **Hilbert L**, Mazurier C. Comparison of three type IIB recombinant von Willebrand factors in their interaction with platelets. European Haematology Association Bruxelles, **1994** (OC)
- Gaucher C, **Hilbert L**, Meriane F, Mazurier C, Pernod G. Type 2 von Willebrand disease resulting from an insertion or deletion in the 509-695 disulphide loop of von Willebrand factor. ISTH Jérusalem **1995** (poster)

- **Hilbert L**, Gaucher C, de Romeuf C, Parquet A, Abgrall JF, Trzeciak C, Mazurier C. Identification of “new” type 2B von Willebrand disease mutations: R543Q, R545P and R578L. European Haematology Association Paris, **1996** (OC)
- **Hilbert L**, Gaucher C, Sié P, Mazurier C. Expression of type 2A von Willebrand disease mutations. Identification of a new mutation: L817P. European Haematology Association Paris, **1996** (poster)
- **Hilbert L**, Gaucher C, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in vWD. A new type 2M (“Type B”) vWD mutation (G1324A) also at position 561 of the mature vWF subunit. ISTH Florence **1997** (poster)
- **Hilbert L**, Degallaix F, Jorieux S, Gaucher C, Proulle V, Meyer D, Mazurier C et le réseau INSERM sur les anomalies moléculaires de la maladie de Willebrand (vWD). Identification d’une nouvelle mutation (Gln290His) VWD. GEHT & GRRC **1998** (poster)
- Ribba AS, **Hilbert L**, Lavergne JM, Loisel I, Mazurier C, Meyer D. Quatre mutations, Leu513Pro, Glu596Lys, Ile662Phe et Cys695Tyr du facteur Willebrand sont responsables d’une diminution de liaison à la glycoprotéine Ib plaquettaire. GEHT & GRRC **1998** (OC)
- **Hilbert L**, Jorieux S, Degallaix F, Proulle V, Dreyfus M, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification of a new type 2N von Willebrand disease mutation (Gln290His) in the D3 domain of von Willebrand factor. ISTH Paris, Thromb Haemost **1999**, Aug suppl, p 282, 883 (poster)
- **Hilbert L**, Ruan C, Jorieux S, Fontenay-Roupie M, Stieltjes N, Lavergne JM, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification of two closely located new type 2N von Willebrand disease mutations (Tyr32Cys and Met37Val). ISTH Paris, Thromb Haemost **1999**, Aug suppl, p 281, 882 (poster)
- Ribba AS, **Hilbert L**, Lavergne JM, Fressinaud E, Mazurier C, Meyer D and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Mutations at positions 513, 552, 611 and 695 in the A1 loop of von Willebrand factor induce a type 2A phenotype. Usefulness of botrocetin to distinguish type 2A and 2M von Willebrand disease. ISTH Paris, Thromb Haemost **1999**, Aug suppl, p 510, 1603 (OC)
- Lavergne JM, Fressinaud E, **Hilbert L**, Ribba AS, Proulle V, Pommereuil M, Juhan-Vague I, Mazurier C, Meyer D and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification in type 2M von Willebrand disease of 5 new candidate mutations in the N-terminal part of the A1 loop of von Willebrand factor. ISTH Paris, Thromb Haemost **1999**, Aug suppl, p 283, 888 (poster)
- Mazurier C, Caron C, **Hilbert L**, Jorieux S, Gaucher C, Goudemand J, Fressinaud E, Meyer D and the INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand disease. Type 2N von Willebrand disease – 10 years of diagnostic experience in France. XXIV International Congress of the World Federation of Hemophilia, Montreal Haemophilia **2000**, 6, p 212 (OC)
- Meyer D, Fressinaud E, Lavergne JM, Ribba AS, **Hilbert L**, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Molecular analysis of type 2 von Willebrand disease in France: study of 263 unrelated patients and of 68 distinct mutations. ISTH Paris **2001** (OC)
- Mazurier C, **Hilbert L**, Caron C, Fressinaud E, Goudemand J, Meyer D and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Type 2N von Willebrand disease – phenotypic and genotypic diagnosis experience in France. ISTH Paris, **2001** (OC)
- Federici AB, Berntorp E, Lee CA, Scharrer I, Goudemand J, Lethagen S, Nitu I, Ludwig G, **Hilbert L**, Mazurier C, Mannucci PM on behalf of Biomed 2 European Project on Optimizing Orphan Drug Therapy in Severe Forms of VWD. Biological response of desmopressin and von Willebrand factor gene defects in severe type 1 and 2 von Willebrand disease: results of a multicenter European study. ISTH Paris, **2001** (OC)

- Veyradier A, Dakik O, Lavergne JM, Ribba AS, Girma JP, **Hilbert L**, Mazurier C, Fressinaud E, Meyer D and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Von Willebrand disease "Vicenza" with mutation R1205H of von Willebrand factor (VWF) : study of 18 french patients and of recombinant VWF. ISTH Paris, **2001** (poster)
- **Hilbert L**, Boinot C, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification of a new type 2N VWD mutation (C804F) in exon 18 of the von Willebrand factor gene. ISTH Paris, **2001** (poster)
- **Hilbert L**, Nitu-Whalley I, Duchemin J, Lavergne JM, Jenkins V, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification of two mutations at the same position (V1279I and V1279F) responsible for distinct characteristics of recombinant von Willebrand factor. ISTH Paris, **2001** (poster)
- **Hilbert L**, Lavergne JM, Ternisien C, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Expression of a new type 2A VWD missense mutation, V1604F (Val841Phe) in the von Willebrand factor gene. ISTH Paris, **2001** (poster)
- Lavergne JM, Fressinaud E, Goudemand J, Horellou MH, Ribba AS, **Hilbert L**, Mazurier C, Meyer D and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification of 5 new cysteine mutations in the D3 domain of von Willebrand factor inducing type 2M von Willebrand disease. ISTH Paris, **2001** (poster)
- Mazurier C, **Hilbert L**, Caron C, Fressinaud E, Goudemand J, Meyer D et le réseau INSERM sur les anomalies moléculaires dans la maladie de Willebrand. Bilan du diagnostic phénotypique et génotypique de la maladie de Willebrand de type 2N en France. Société Française d'Hématologie Paris, *Hématologie* **2001**, vol 7, Abs 238 p 143 (poster)
- **Hilbert L**, Messenger SL, Ribba AS, Mazurier C, Schneppenheim R, Goodeve AC, Castaman G, Federici AB, Battle J, Eikenboom JJ, Ingerslev J, Habart D, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Peake I. In vitro expression of 4 novel mutations identified in type 1 von Willebrand disease. ISTH Birmingham, **2003** (OC)
- **Hilbert L**, D'Oiron R, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification and expression of the first type 2N von Willebrand disease mutation (E1078K) located in exon 25 of von Willebrand factor gene. ISTH Birmingham, **2003** (poster)
- **Hilbert L**, Nurden P, Caron C, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C and the INSERM Network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Type 2N von Willebrand disease due to compound heterozygosity for the frequent R854Q type 2N mutation and a new R763G mutation abolishing the cleavage of von Willebrand factor propeptide. ISTH Birmingham, **2003** (poster)
- **Hilbert L**, Federici AB, Baronciani L, Mazurier C. Expression of a new candidate mutation, G1629R, identified in an Italian patient with type 2A von Willebrand disease. ISTH Birmingham, **2003** (poster)
- Tout H, Houllier A, Obert B, Ribba AS, **Hilbert L**, Mazurier C, Meyer D, Girma JP. Stability of 19 mutated recombinant von Willebrand factor to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). ISTH Birmingham, **2003** (poster)

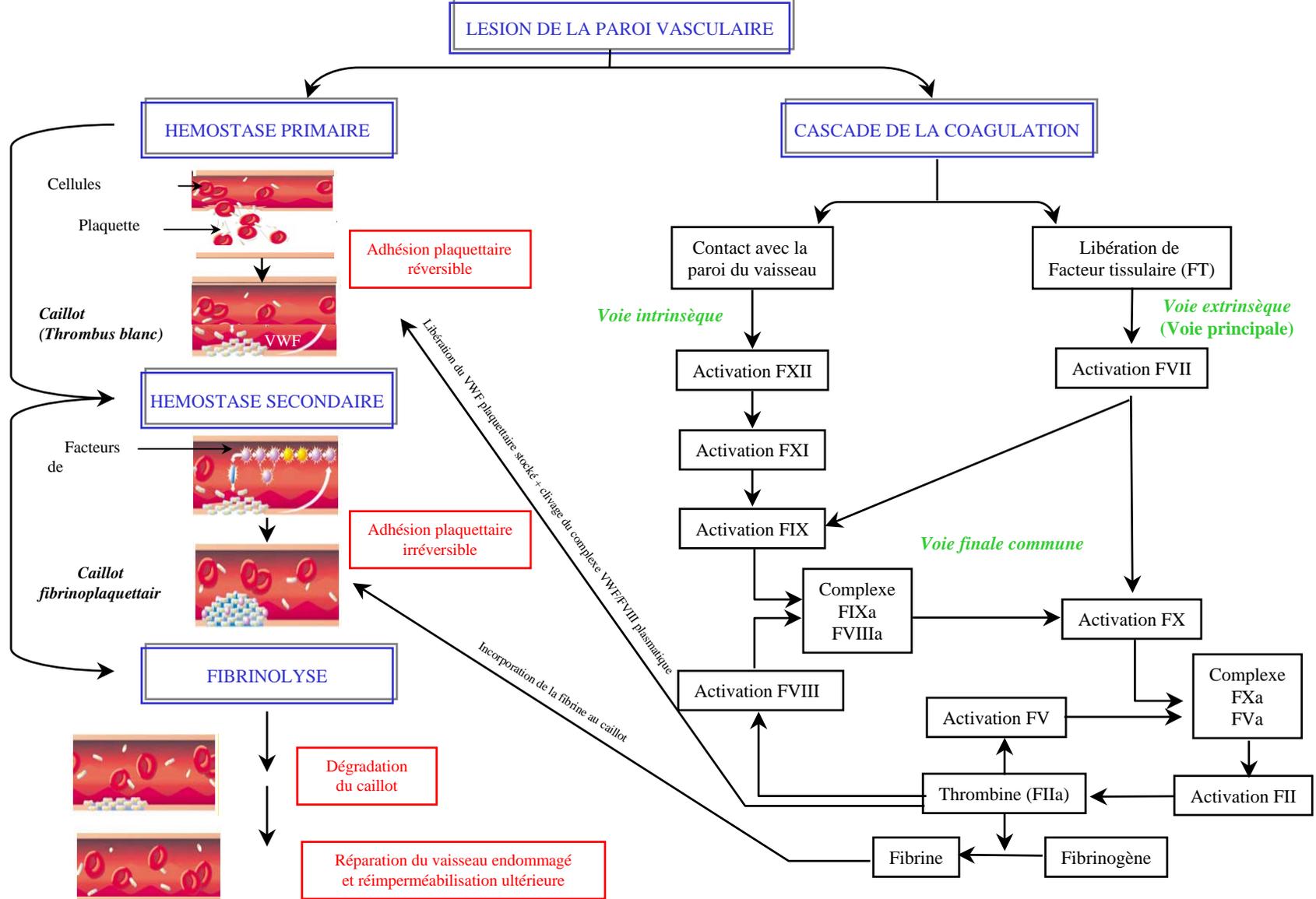


Figure 2 : Schéma général de l'hémostase.

La lésion d'un vaisseau entraîne une série de réactions en chaîne qui aboutissent à la formation de fibrine qui consolide le caillot plaquettaire. La cascade d'activations des facteurs de la coagulation est déclenchée, d'une part, par le facteur tissulaire libéré par les tissus lésés (voie extrinsèque) et, d'autre part, par le contact du sang avec les structures internes de la paroi du vaisseau (voie intrinsèque).

INTRODUCTION GENERALE

Le sang est une substance fluide qui contient divers éléments que l'on peut séparer en 2 catégories: les éléments cellulaires (plaquettes, globules rouges, globules blancs) et le plasma, un liquide de couleur jaune qui transporte ces éléments. Le plasma est riche en protéines très importantes (albumine, immunoglobulines) et en particulier en facteurs de coagulation. Certains de ces facteurs sont numérotés en chiffres romains (facteur VIII, IX...), d'autres portent des noms propres (facteur Willebrand ...).

Le processus physiologique permettant de limiter les pertes sanguines provoquées lors de lésions de l'endothélium vasculaire est artificiellement découpé en trois phases qui sont étroitement intriquées à l'état physiologique (**Figure 2**) :

- **L'hémostase primaire**, est caractérisée par la formation rapide, au niveau de la lésion vasculaire, d'un caillot riche en plaquettes et pauvre en fibrine grâce à l'adhésion et l'agrégation des plaquettes sanguines sur le sous-endothélium exposé. Elle implique outre les plaquettes et le vaisseau, le facteur Willebrand (VWF).
- **L'hémostase secondaire (ou coagulation plasmatique)** induit la formation d'un réseau de fibrine qui permet de renforcer le caillot plaquettaire, grâce à la transformation du fibrinogène en fibrine, à la suite d'une succession de réactions complexes faisant intervenir à la fois des enzymes et des cofacteurs, regroupés sous le terme de **cascade de la coagulation (Figure 2)**. Ce phénomène est déclenché principalement par l'activation du facteur VII (FVII) au contact d'un récepteur cellulaire appelé facteur tissulaire. Le FVII devient alors le FVII activé (FVIIa) qui active soit directement le facteur X (FX) en FX activé (FXa), soit le facteur IX (FIX) en FIX activé (FIXa). Le FIXa seul est peu efficace, il a besoin pour augmenter son action de la présence de Facteur VIII (FVIII). Le complexe FIXa + FVIIIa active lui aussi le FX en FXa. La suite de la coagulation permet de générer un caillot de fibrine qui vient consolider le 1^{er} thrombus.
- La **fibrinolyse** est un processus de régulation permettant d'éviter que le caillot, en train de se former, ne s'étende trop et obture complètement le vaisseau. Ainsi, la fibrinolyse assure-t-elle la lyse séquentielle de la fibrine du caillot formé lors de l'hémostase secondaire.

Le VWF intervient dans l'hémostase primaire et secondaire et des anomalies qualitatives ou quantitatives de ce facteur sont responsables d'une maladie hémorragique constitutionnelle, la maladie de Willebrand (VWD).

L'introduction générale de ce travail se divise en 2 parties :

- la 1^{ère} partie présente les caractéristiques structurales et fonctionnelles du VWF indispensables à la compréhension de ses rôles,
- la seconde partie présente la maladie de Willebrand, son diagnostic, ses origines et son traitement.

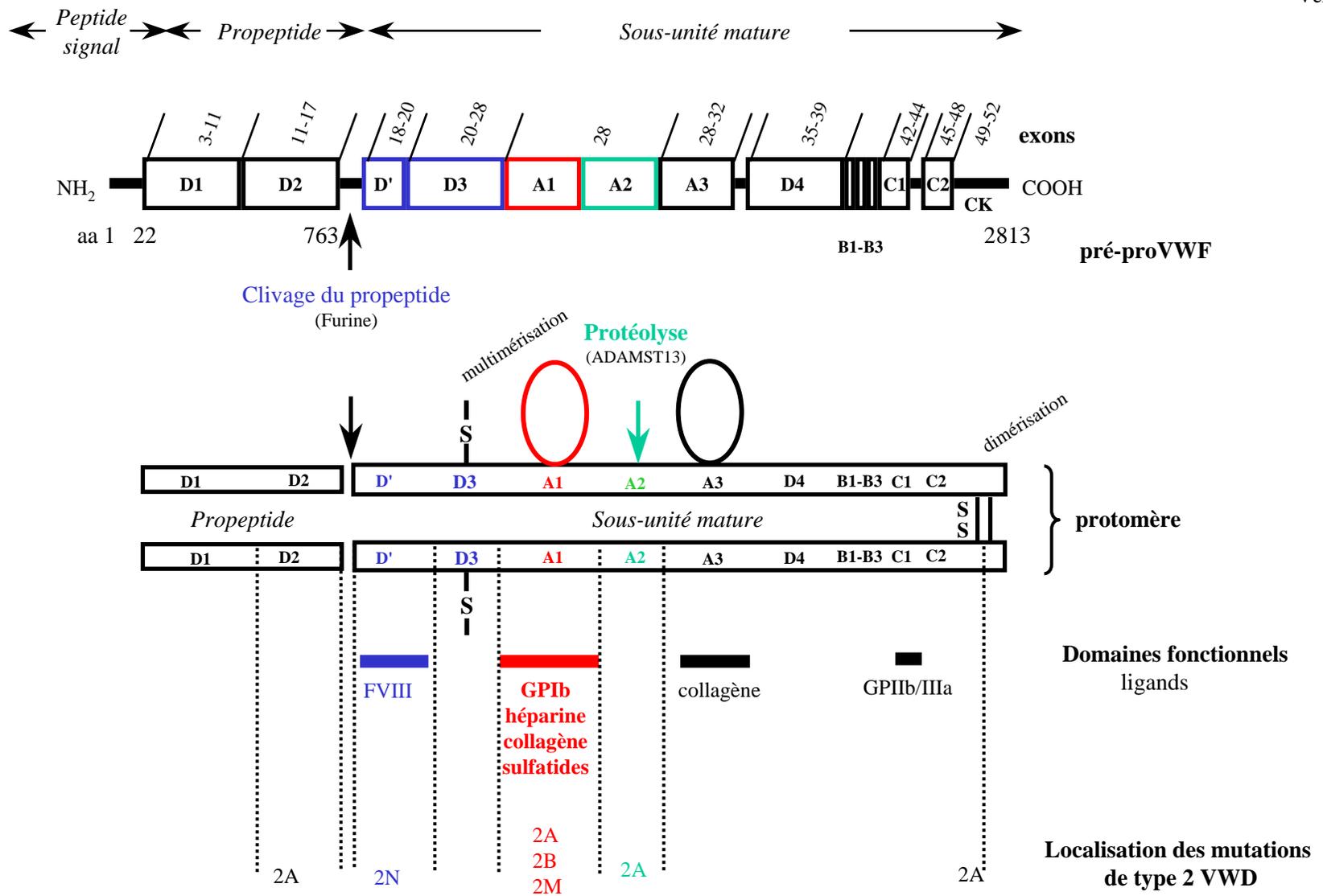


Figure 3 : Représentation schématique du pré-pro-VWF.

Localisation des domaines d'homologie structurale (A-D) du pré-pro-VWF, des domaines fonctionnels de la sous-unité mature et des phénotypes de VWD induits par des mutations dans ces domaines .

I – LE FACTEUR WILLEBRAND

A – Biosynthèse et structure

1 – Biosynthèse

Le VWF est une glycoprotéine synthétisée par les cellules endothéliales [Jaffe et coll 1974] et les mégacaryocytes (précurseurs des plaquettes sanguines) [Sporn et coll 1985].

Le gène du VWF est localisé sur le bras court du chromosome 12 près de sa portion terminale [Mancuso et coll 1989]. C'est un gène de 178 kilobases (kb), très polymorphe, comprenant 52 exons. Leur taille varie de 40 paires de bases (pb) à 1379 pb pour le plus grand, l'exon 28. La taille des introns est également très variable, de 97 à 19 900 pb. Il existe un pseudo-gène situé sur le chromosome 22, dont la séquence correspond à la région centrale du gène du VWF (exons 23 à 34) et présente une homologie de 97% avec celui-ci [Mancuso et coll 1991]. Le clonage de l'ADNc du VWF a été réalisé par 4 équipes indépendantes en 1985 (Ginsburg et coll, Lynch et coll, Sadler et coll, Verweij et coll) grâce à une banque d'ADNc construite à partir des acides ribonucléiques messagers (ARNm) isolés de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine en culture. L'ARN messenger, de 9 kb, code pour un précurseur, le pré-pro-VWF, de 2813 acides aminés (aa), comprenant un peptide signal (22 aa), un propeptide de 741 aa et une sous-unité mature (2050 aa) (**Figure 3**).

Ce précurseur subit, dans la cellule, de nombreuses modifications post-traductionnelles [Wagner 1990]:

- clivage du peptide signal par la furine (aa 1 à 22 de la partie N-terminale du VWF)
- N- glycosylation et formation, dans le réticulum endoplasmique granuleux, de ponts disulfure du côté C-terminal pour constituer des dimères du précurseur,
- assemblage dans l'appareil de Golgi de ces dimères pour former des multimères de haut poids moléculaire (HPM),
- O-glycosylation et sulfatation
- puis clivage, dans les granules de stockage cellulaires, du propeptide (aa 23 à 763)

Le VWF est constitué de multimères de différentes tailles formés à partir de répétitions des unités monomériques, le protomère étant un dimère de 500 kDa constitué de 2 sous-unités identiques. Ainsi, la taille du VWF varie de 500 à 20 000 kDa [Wise et coll 1988]. Cette organisation moléculaire est importante car elle peut fournir des sites de contact multiples expliquant pourquoi les multimères les plus lourds sont les meilleurs promoteurs de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire. Cependant, le degré de multimérisation du VWF est régulé par une protéolyse extracellulaire, probablement pour prévenir la formation de thrombi pathologiques. Cette protéolyse est le fait d'une protéase spécifique récemment isolée, l'ADAMST13 qui coupe entre les aa M1605 (Met842) et Y1606 (Tyr843) du domaine A2.

Il est à noter que, dans ce mémoire, la position d'un aa sera donnée selon 2 nomenclatures : tout d'abord sa position sur le pré-pro-VWF suivie de sa position sur la sous-unité mature (indiquée entre parenthèses). Le nom de l'aa sera donné par son code à 1 lettre lorsque la position sera donnée sur le pré-pro-VWF ou à 3 lettres quand la position sera donnée sur la sous-unité mature du VWF.

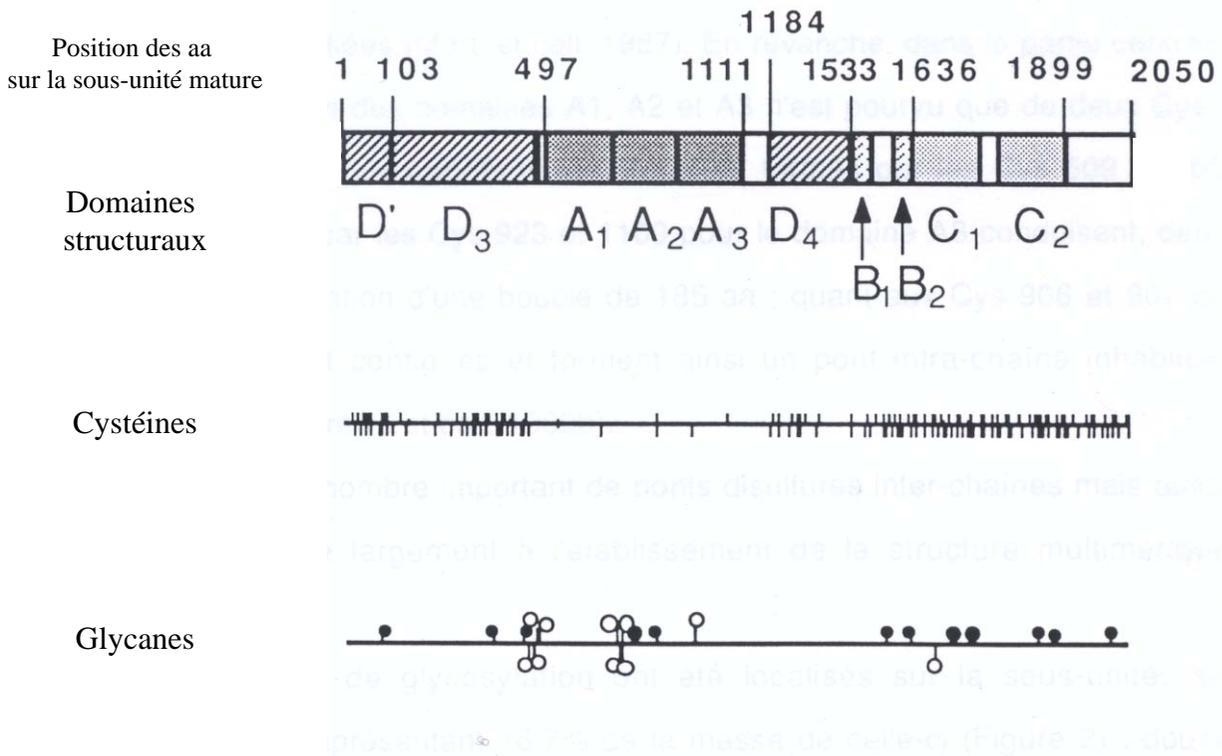


Figure 4 : Représentation schématique de la sous unité mature du VWF.

Sont figurés les différents domaines A, B, C et D, la position des résidus cystéines et celle des chaînes N-glycosylées (●) et O-glycosylées (○).

[D'après Titani et coll 1986]

2 – Stockage et sécrétion

Le VWF, stocké dans les granules α des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, est sécrété à la fois vers le sous-endothélium et vers le plasma, les cellules endothéliales étant la principale source de VWF plasmatique et sous-endothélial. La concentration plasmatique est environ de 7 $\mu\text{g/ml}$ (100 IU/dl) mais la fourchette des valeurs normales est large, classiquement comprise entre 50 et 200 IU/dl. De nombreux facteurs comme le groupe sanguin et les caractéristiques raciales influencent le taux plasmatique de VWF. Ainsi, le taux de VWF plasmatique est plus bas chez les sujets de groupe O [Gill et coll 1987] et chez les sujets blancs [Conlan et coll 1993]. Cette concentration s'élève au cours de certaines circonstances physiologiques (exercice physique, stress, grossesse, âge) et dans de très nombreux et divers états pathologiques [Blombäck et coll 1992].

Le VWF synthétisé par la cellule endothéliale peut suivre **2 voies de sécrétion** : La **voie constitutive**, prépondérante, permet la libération continue du VWF vers le plasma et vers la matrice sous-endothéliale. La **voie inductible** permet, en réponse à des stimuli physiologiques (thrombine, adrénaline, desmopressine), la sécrétion du VWF stocké dans les corps de Weibel-Palade et cela préférentiellement dans le sous-endothélium. La sécrétion du VWF par les plaquettes obéit uniquement à une voie régulée; celle-ci est secondaire à une activation plaquettaire par des agonistes tels que l'adénosine diphosphate (ADP) et la thrombine et aboutit à la libération du VWF dans le plasma. Alors que le VWF nouvellement constitué est relargué dans la circulation sanguine en 2 heures, le VWF stocké est libéré rapidement, en moins de 10 minutes.

3 – Structure primaire

Le VWF est une glycoprotéine constituée de 4 types de domaines homologues (A à D) répétés de 2 à 5 fois et du domaine CK localisé du côté C-terminal de la molécule [Shelton-Inloes et coll 1986]. Le propeptide contient les domaines D1 et D2. La sous unité mature du VWF comprenant les aa 764 à 2813 du pré-pro-VWF (1 à 2050) est constituée de la succession des domaines D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK (**Figure 3**).

Les sous-unités de VWF sont riches en cystéines (8,3%) [Titani et coll 1986]. Toutes ces cystéines sont impliquées dans des ponts disulfures intra ou interchaînes stabilisant ainsi la structure des régions où elles sont impliquées [Marti et coll 1987]. Cependant la distribution de ces cystéines n'est pas uniforme [Titani et coll 1986]. Elles sont particulièrement abondantes dans les extrémités N-et C-terminales de la molécule ; en effet, 53 des 232 cystéines sont localisées entre les aa 764 (1) et 1272 (509) du VWF et 96 d'entre elles sont entre les aa 2123 (1360) et 2813 (2050) (**Figure 4**). Les cystéines du domaine CK interviennent dans le processus de dimérisation des monomères du VWF, celles du domaine D3 sont impliquées, elles, dans la multimérisation des dimères. Les cystéines sont beaucoup plus rares dans la région centrale de la molécule. Ainsi, les 3 domaines A du VWF ne contiennent chacun que 2 cystéines. Ces cystéines induisent la formation de 2 boucles identiques de 185 aa entre les cystéines 1272 (509) et 1458 (695) du domaine A1 et les cystéines 1686 (923) et 1872 (1109) du domaine A3. Le domaine A2 ne comprend pas de structure en boucle, les 2 cystéines étant adjacentes en position 1669-1670 (906-907).

Il faut également souligner l'importance des oligosaccharides (18,7% en poids) [Chopek et coll 1986], distribués sur 12 sites de N-glycosylation (Asn) et 10 sites de O-glycosylation (Thr ou Ser) dont la répartition n'est pas uniforme [Titani et coll 1986 ; Samor et coll 1989]. Ainsi, 8 des O-glycanes et 2 des N-glycanes sont regroupés dans deux régions étroites, de part et d'autre de la boucle du domaine A1 (**Figure 4**).

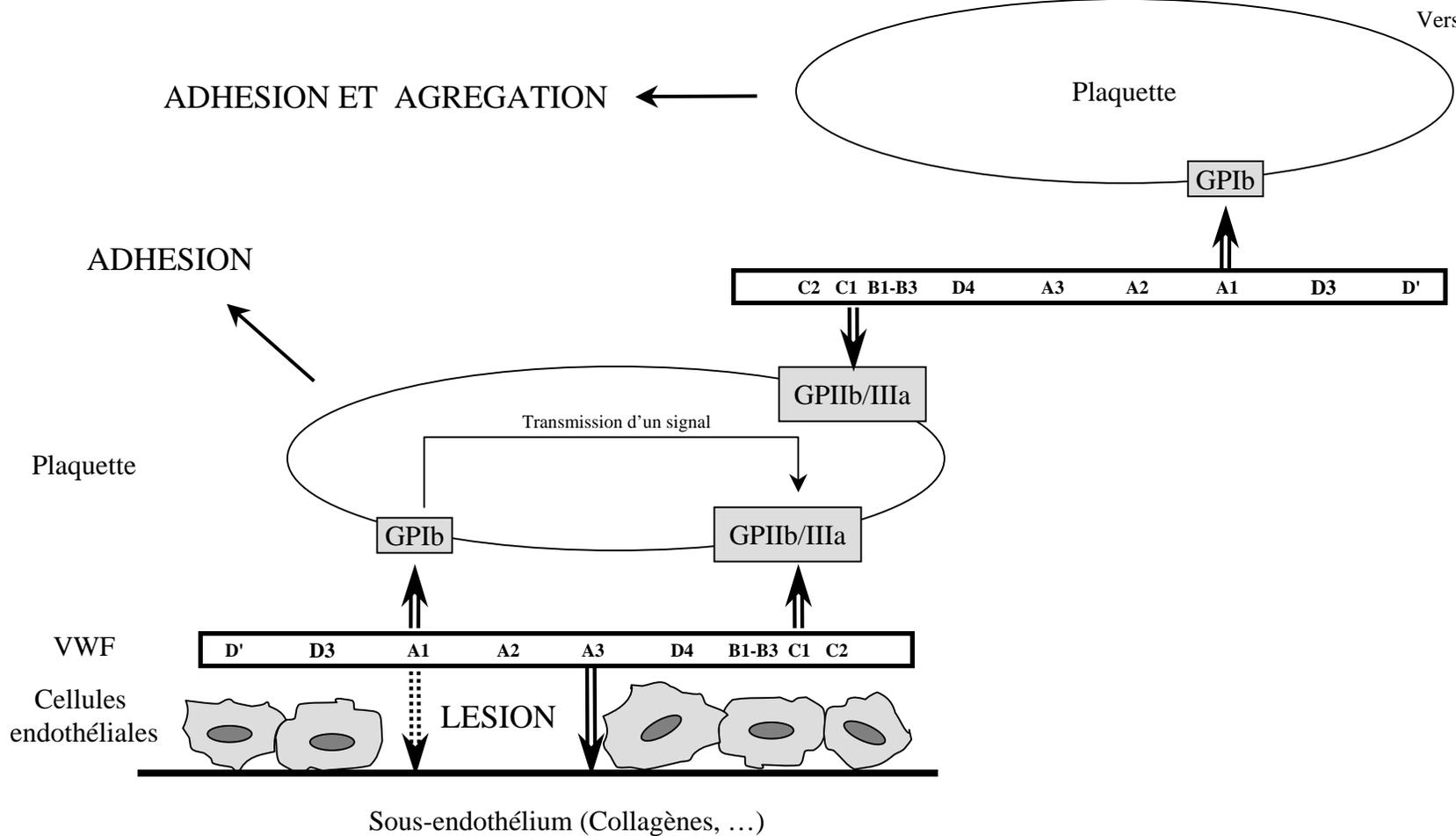


Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme d'action du VWF dans l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium vasculaire et dans l'agrégation plaquettaire.

Dans l'adhésion, le VWF joue le rôle de pont moléculaire entre les plaquettes et le sous-endothélium grâce à sa liaison aux collagènes essentiellement par son domaine A3 et sa liaison à la GPIb par son domaine A1.

Dans l'agrégation, la polyvalence du VWF permet la formation d'un réseau reliant plusieurs plaquettes entre elles.

Les flèches doubles \Rightarrow indiquent une liaison entre les constituants.

Les flèches simples \rightarrow indiquent le phénomène induit par ces liaisons.

B – Fonctions et rôles dans l'hémostase

Le VWF est un exemple de molécule à multiples domaines fonctionnels. Plusieurs d'entre eux ont été localisés sur la sous-unité mature du VWF et sont représentés sur la **figure 3**. Grâce à ces domaines fonctionnels, le VWF, en se fixant à divers ligands, joue à la fois un rôle dans l'hémostase primaire et dans la coagulation.

1 – Rôle dans l'hémostase primaire

Le VWF plasmatique joue, tout comme le VWF synthétisé par les mégacaryocytes et stocké au niveau des granules des plaquettes, un rôle primordial dans le processus de l'hémostase primaire qui commence par l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium vasculaire, conduisant à l'agrégation plaquettaire et à la formation du thrombus plaquettaire (**Figure 5**).

Le VWF forme des « ponts » entre des sites de liaison spécifiques :

- Sur les plaquettes et le sous-endothélium initiant l'adhésion plaquettaire
- Entre les plaquettes elles-même modulant l'agrégation plaquettaire

La séquence des événements conduisant à la formation du caillot peut être définie ainsi :

- Liaison du VWF à des constituants du sous-endothélium
- Modification conformationnelle du VWF lié
- Liaison de ce VWF au récepteur plaquettaire GPIb-IX qui conduit à l'adhésion plaquettaire initiale
- Activation plaquettaire et transmission d'un signal intraplaquettaire induisant l'exposition de la GPIIb/IIIa sur la membrane plaquettaire
- Liaison du VWF à la GPIIb/IIIa avec pour conséquence, l'étalement des plaquettes, leur adhésion irréversible et leur agrégation

2 – Rôle dans la coagulation

Le VWF plasmatique, en se liant au FVIII, cofacteur essentiel de la génération de FXa, le protège d'une dégradation enzymatique [Koedam et coll 1990]. Le VWF se lie au FVIII par le biais de séquences peptidiques situées dans ses domaines D' et D3, pour former un complexe non covalent. En absence de VWF plasmatique, le FVIII est labile et est détruit très vite (la 1/2 vie du FVIII est d'environ 1–2 heures alors qu'en présence de VWF, elle atteint 10–12 heures). Ainsi, en cas de défaut de VWF, le FVIII est parallèlement diminué.

En étant lié au FVIII, le VWF inhibe l'interaction du FVIII avec différentes protéases du système de la coagulation, dont le FIX, le facteur FX et la protéine C [Koedam et coll 1988]. Il bloque également la liaison du FVIII aux membranes phospholipidiques chargées négativement et prévient l'activation prématurée du système de la coagulation. Le VWF intervient donc de manière indirecte dans la coagulation plasmatique. C'est la thrombine qui libère le FVIII du VWF et l'active en FVIIIa qui amplifie plus de 10 000 fois l'activation du FX par le FIXa.

II – LA MALADIE DE WILLEBRAND

La VWD a été décrite en 1926, par un médecin finlandais, le Docteur Erik von Willebrand sous le nom de pseudo-hémophilie, chez plusieurs membres d'une même famille de l'archipel des îles Åland (mer Baltique).

Cette affection hétérogène, causée par des **défauts quantitatifs et qualitatifs** du VWF est la plus fréquente des maladies hémorragiques constitutionnelles chez l'Homme et les animaux.

A – Classification

On distingue actuellement 3 types principaux de VWD. Le Comité Scientifique et de Standardisation (SSC) sur la VWD de la Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase (ISTH) a proposé en 1994, la classification suivante [Sadler 1994] :

1 – Le type 1

Il correspond à un **défaut quantitatif partiel** en VWF (70 à 80 % des patients VWD). La synthèse et la répartition des multimères du VWF sont normales mais il y a diminution modérée de la concentration de cette molécule dans le plasma (10 – 40 IU/dl). Dans les plaquettes, la concentration en VWF est normale ou abaissée et plusieurs sous-types ont été identifiés en fonction du contenu plaquettaire.

2 – Le type 2

Ici, le facteur VWF est présent à une concentration souvent normale (50 – 200 IU/dl) mais certaines fonctions de ce facteur sont altérées induisant des anomalies fonctionnelles ou/et structurales distinctes (**anomalie qualitative** du VWF) (15 à 20 % des patients VWD).

- **le sous-type 2A** : L'agrégation plaquettaire en présence de ristocétine (RIPA) est très diminuée voire nulle. Les multimères de HPM et de poids moléculaire intermédiaire (IPM) sont absents dans le plasma, variables dans les plaquettes avec souvent une augmentation d'intensité des multimères de bas poids moléculaire (BPM). Le phénotype 2A semble résulter de 2 mécanismes physiopathologiques distincts en corrélation avec la distribution des multimères du VWF dans les plaquettes.
 - Chez certains patients, les formes de HPM sont aussi absentes dans les plaquettes traduisant une anomalie de la biosynthèse et du transport intracellulaire du VWF entraînant un assemblage anormal des multimères et la sécrétion partielle de formes de BPM.
 - Chez d'autres patients, la distribution des multimères est normale dans les plaquettes. Tous les multimères du VWF sont sécrétés mais les formes de HPM sont dégradées suite à une sensibilité accrue à la protéase plasmatique. Au niveau des plaquettes et des cellules endothéliales, le VWF n'étant pas soumis à cette dégradation protéolytique extracellulaire, a une structure multimérique normale.
 - Le sous-type 2A regroupe aussi d'autres variants précédemment classés sous le nom de variants IIC à IIH, caractérisés par une absence ou une diminution des multimères de HPM avec un profil multimérique particulier.

- **le sous-type 2B** : correspond à une réactivité augmentée du VWF vis-à-vis de la GPIIb plaquettaire. Cette anomalie fonctionnelle peut provoquer une liaison spontanée de multimères de HPM aux plaquettes circulantes, conduisant le plus souvent à la disparition de ces multimères du plasma et à une thrombopénie. Le profil multimérique du VWF plaquettaire de ces patients est normal.

La distinction entre VWD de type 2B et pseudo-maladie de Willebrand est très difficile et réservée à des laboratoires hautement spécialisés. La pseudo-maladie de Willebrand est une thrombopathie où il existe une augmentation de l'affinité de la GPIIb plaquettaire pour le VWF. Les multimères de HPM du VWF se lient à la GPIIb anormale, ce qui induit leur disparition du plasma et une thrombopénie modérée comme dans le type 2B VWD. Il existe aussi une augmentation de la sensibilité du plasma riche en plaquettes (PRP) à la ristocétine se manifestant par une agrégation en présence de faibles doses de cet agoniste. Cependant des plaquettes normales suspendues dans le plasma du patient ont une sensibilité normale à la ristocétine, alors que les plaquettes du patient suspendues dans un plasma normal ont une sensibilité accrue.

- **Le sous-type 2M** : regroupe les variants moléculaires présentant une diminution de l'interaction du VWF plasmatique avec les plaquettes mais cette anomalie fonctionnelle n'est pas liée à une absence de multimères de HPM.
- **Le sous-type 2N ou Normandie** : est dû à une anomalie de liaison du VWF au FVIII. Il existe un déficit en FVIII alors que généralement le taux de VWF est normal et que tous les multimères du VWF sont présents. Ce sous-type a été longtemps confondu avec l'hémophilie A mineure et seule l'étude de la liaison du VWF plasmatique au FVIII permet de distinguer ces 2 affections.

3 – Le type 3

Il y a absence quasi complète de VWF (**VWF non mesurable**) (1 à 5 % des patients VWD). Ce type représente la forme la plus sévère mais heureusement rare de la maladie (fréquence # 1/10⁶).

B – Manifestations cliniques

Les symptômes varient selon le degré de sévérité et le sous-type de la maladie.

- L'expression clinique du **type 1** est d'ordinaire minime, sauf une exagération des menstruations possible. Par contre, il peut y avoir des complications hémorragiques sévères lors d'interventions chirurgicales ou lors d'extractions dentaires. Il est donc souhaitable de poser le diagnostic le plus tôt possible. Pendant la grossesse, il y a élévation du taux du VWF, ce qui permet une grossesse et un accouchement sans complications (contrairement aux types 2 et 3). Lorsque le contenu plaquettaire est normal, le syndrome hémorragique est plus discret.
- Dans les formes de **type 2**, la tendance à saigner est très variable d'un individu à l'autre si bien que, même au sein d'une même famille, les symptômes peuvent être différents d'un individu atteint à un autre. Les saignements concernent surtout la peau et les muqueuses. Ils peuvent être extériorisés: saignements de nez (épistaxis), saignements des gencives (gingivorragies), règles abondantes chez la femme (ménorragies), parfois saignement digestif (vomissement de sang et sang dans les selles) et sang dans les urines. Les saignements non extériorisés se situent essentiellement au niveau de la peau: ecchymoses ("bleus"),

(ATCD hémorragiques; histoire familiale; âge et sexe; groupe ABO; médicaments ...)

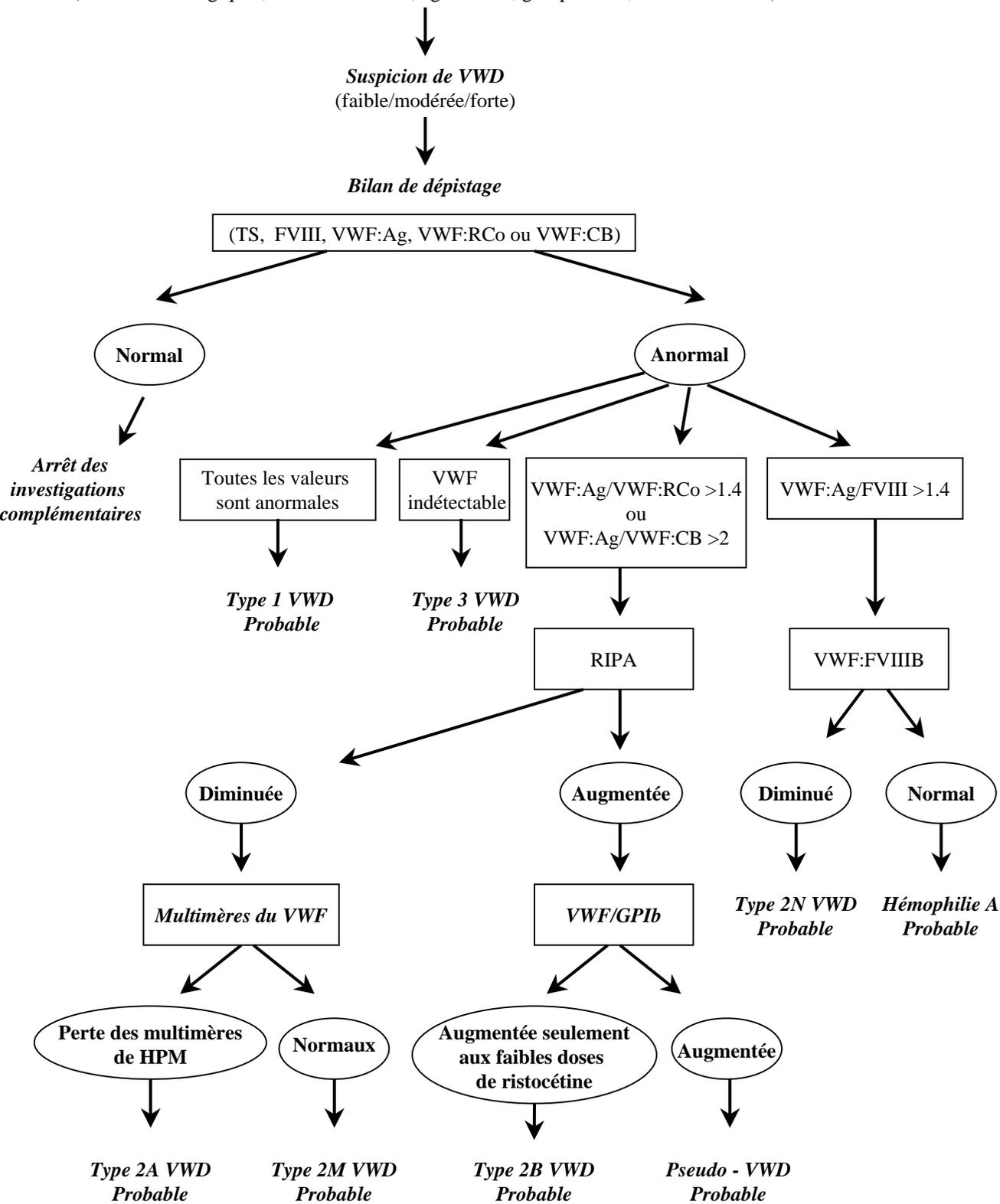


Figure 6 : Diagnostic biologique de la maladie de Willebrand.

L'interrogatoire du patient constitue une étape capitale dans le diagnostic clinique. Une série de tests de laboratoire est nécessaire pour confirmer la VWD et son type.

saignements prolongés lors de coupures ou de plaies. Les saignements post-traumatiques ou chirurgicaux, notamment lors d'extraction dentaire ou d'amygdalectomie sont assez fréquents. L'évolution dans le temps est variable avec des périodes d'accalmie et des périodes où les saignements sont plus fréquents. Les signes s'atténuent fréquemment avec l'âge. Pendant la grossesse, le taux de VWF augmente mais ce facteur n'étant pas fonctionnel, les risques hémorragiques demeurent au moment de l'accouchement comparables à ce qu'ils étaient avant la grossesse.

- La VWD de **type 3** se manifeste par des accidents hémorragiques dès la petite enfance. Cette forme sévère de la VWD comporte aussi un trouble de la coagulation lié au déficit en FVIII induit par le déficit majeur en VWF. En premier lieu, il y a saignement des muqueuses au niveau de la bouche, de l'estomac, de l'intestin. La VWD de type 3 ressemble, par certains aspects, à l'hémophilie avec apparition d'hématomes musculaires et parfois de saignements dans l'articulation lorsque l'enfant commence à ramper et à marcher. Chez les femmes, on peut avoir une importante augmentation des menstruations pouvant entraîner des anémies chroniques. Des hémorragies ovariennes peuvent aussi survenir. Il n'y a aucune augmentation du taux de VWF ou de FVIII durant la grossesse.

C – Origine

Cette maladie se transmet le plus souvent génétiquement. La transmission génétique est autosomale ce qui explique qu'elle atteint indifféremment hommes et femmes, contrairement à l'hémophilie. Dans le type 1 et le type 2, la transmission est le plus souvent autosomale dominante (il suffit qu'un des deux parents transmette le gène anormal pour que l'enfant déclare la maladie). Le risque est donc de un sur 2 pour un parent atteint de VWD de donner naissance à un enfant lui-même atteint. La pathologie peut rester néanmoins inconnue sous sa forme atténuée, certains de ces hétérozygotes étant, en dehors d'un contexte traumatique ou chirurgical, asymptomatiques. Certains types 2 (type 2N et certaines formes de type 2A) peuvent être de transmission récessive.

Le type 3 se transmet, lui, suivant un mode autosomal récessif (il faut que les deux parents transmettent le gène portant l'anomalie pour que l'enfant soit atteint). Ainsi, deux parents ayant une VWD asymptomatique peuvent donner naissance à un enfant atteint d'une forme sévère de la maladie.

Il arrive qu'un patient malade naisse de deux parents sains et non porteurs de mutation VWD. Ce phénomène peut être le fait d'une mutation génétique spontanée dans les gonades de l'un des parents ou d'une modification au cours du développement fœtal. Par contre, dans la descendance de ce patient porteur de cette nouvelle mutation, on retrouve les caractéristiques de transmission de l'hérédité autosomale dominante.

La VWD acquise (non héréditaire) est rare et peut être associée à certaines autres maladies (autoimmunes, myélomes ...). Elle est due à des auto-anticorps inhibant la fonction du VWF et pouvant entraîner l'apparition de la maladie. Sa fréquence exacte est difficile à apprécier en raison du très grand nombre de formes ; 250 patients sont répertoriés au niveau international.

D – Diagnostic biologique (Figure 6)

Les circonstances et l'âge de découverte de cette affection sont très variables. Elle peut se faire:

- De façon fortuite, lors d'un bilan préopératoire
- Lors de l'exploration d'une symptomatologie hémorragique spontanée ou post-traumatique
- Lors d'une enquête familiale

La maladie est plus fréquemment diagnostiquée chez les femmes, qui sont confrontées au risque hémorragique lors des menstruations et des accouchements. Ainsi une étude a indiqué que le diagnostic de VWD était porté chez 13% de femmes consultant pour ménorragies et bénéficiant d'une exploration de l'hémostase [Kadir et coll 1998].

Bien que la VWD se présente souvent sous sa forme mineure, une détection minutieuse est importante:

- Pour la prévention d'un risque hémorragique en situation chirurgicale,
- Pour la prévention des formes sévères de la VWD dans le cadre d'un conseil génétique.

L'interrogatoire précis du patient sur ses antécédents personnels et familiaux constitue une étape capitale du diagnostic clinique. Lors d'une suspicion de VWD, une série de tests sanguins de laboratoire est nécessaire pour confirmer la présence de la maladie. On peut différencier les examens de routine qui permettent le diagnostic de la maladie de ceux effectués dans des laboratoires spécialisés qui permettent l'identification de son type et de son sous-type.

1 – Examens de routine

• Temps de saignement (TS)

La technique de Duke (à l'oreille), peu sensible, a été progressivement remplacée par la technique d'Ivy (piqûre ou incision au niveau de l'avant-bras). Le TS est allongé chez presque tous les patients VWD qui ont une histoire clinique, mais il peut être normal comme c'est le cas pour le sous-type 2N. Il est à noter qu'un allongement du TS n'est pas spécifique d'une anomalie du VWF ; il peut aussi indiquer une thrombopathie ou une thrombopénie.

• Numération des plaquettes

Elle doit être réalisée chez tout patient ayant un syndrome hémorragique. Bien que la numération soit le plus souvent normale, une thrombopénie peut être observée dans le sous-type 2B.

• Dosage de FVIII

Un dosage chromométrique de l'activité procoagulante du FVIII (FVIII:C) est réalisé sur plasma pauvre en plaquettes (PPP). Un des rôles du VWF étant d'assurer la protection et le transport du FVIII dans le plasma, le taux de FVIII peut donc refléter indirectement une anomalie du VWF. Ainsi, dans le sous-type 2N et le type 3, il est constamment diminué mais jamais nul. Dans les variants moléculaires avec anomalie qualitative du VWF touchant uniquement sa fonction dans l'hémostase primaire, il est le plus souvent normal ou subnormal.

• Dosage immunologique du VWF (VWF:Ag)

Il permet l'évaluation de la molécule, indépendamment de son activité. Il est réalisé sur PPP grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques le plus souvent par des techniques ELISA. Dans le type 1, le taux de VWF:Ag plasmatique est plus ou moins diminué alors que le taux de VWF:Ag plaquettaire est parfois normal. Certains patients de type 2 peuvent avoir des taux de VWF:Ag normaux. Chez les patients de type 3, le VWF:Ag est indétectable dans le plasma et dans les plaquettes.

• Dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo)

Ce test mesure la capacité du VWF à induire *in vitro* l'agglutination de plaquettes en présence de ristocétine. Il est donc le reflet de l'activité du VWF dans l'hémostase primaire et constitue le dosage le plus prédictif de la VWD. Le VWF:RCo plasmatique est indétectable dans les formes graves (type 3), parallèle au déficit en VWF:Ag dans les anomalies quantitatives partielles (type 1) et notablement plus diminué que le taux de VWF:Ag dans les anomalies qualitatives (types 2A et 2M). Associé à la mesure du TS, il est un élément clé du diagnostic de tous les types de la maladie, excepté du sous-type 2N et de certains patients 2B.

- **Etude de l'agrégation plaquettaire en présence de ristocétine (RIPA)**

Ce test (Ristocetin-Induced Platelet Aggregation), effectué sur du plasma riche en plaquettes (PRP), mesure l'agrégation des plaquettes en présence de diverses concentrations de ristocétine. La ristocétine induit la liaison du VWF à la GPIb, ce qui entraîne une activation puis une agrégation plaquettaire dépendante de la GPIIb/IIIa. L'agrégation est nulle quelque soit la concentration de ristocétine chez les patients ayant le VWF:RCo effondré (de type 1, 2A et de type 3). Chez les patients de sous-type 2B, l'interaction du VWF avec la GPIb est anormalement augmentée et l'agrégation est initiée en présence de faibles doses de ristocétine (< 0.75 mg/ml), insuffisantes pour induire l'agrégation d'un PRP témoin. Dans le sous-type 2N, le RIPA est normal. Chez les autres patients, l'agrégation est diminuée en présence de ristocétine à concentration > 0.75 mg/ml.

Grâce à ces tests, le type de VWD présenté par le patient pourra être déterminé mais la précision du sous-type de VWD nécessite des tests complémentaires réalisés dans des laboratoires plus spécialisés.

2 – Examens spécialisés

- **Etude de la distribution des multimères du VWF**

La distribution des multimères du VWF est déterminée par électrophorèse du PPP dans un gel d'agarose (le plus souvent 1 à 1,5 %) contenant un agent dissociant, le dodécyl sulfate de sodium (SDS) afin de séparer les multimères selon leur masse. Ces multimères sont ensuite révélés par des anticorps spécifiques. Dans la forme sévère de VWD (type 3), les multimères sont indétectables. Une concentration diminuée de VWF avec une répartition normale de toutes les tailles de multimères indique une anomalie quantitative de type 1. La perte des multimères de HPM correspond à une anomalie qualitative (type 2). La classification de certains sous-types 2 nécessite une électrophorèse plus résolutive avec séparation de chaque multimère en plusieurs bandes (gel avec une concentration d'agarose plus élevée, 2 à 3%).

- **Etude de la capacité de liaison du VWF au FVIII (VWF:FVIII)**

Ce test mesure la fixation de FVIII purifié exogène sur le VWF plasmatique du patient. Il est l'élément biologique essentiel pour diagnostiquer le sous-type 2N dans lequel cette fonction est nulle ou très diminuée. Il permet de faire la distinction entre l'hémophilie A et la VWD de type 2N, chez les patients ayant un déficit isolé modéré ou mineur en FVIII.

- **Etude de la capacité de liaison du VWF à la GPIb plaquettaire**

La liaison du VWF à des plaquettes normales (VWF/GPIb) induite par la ristocétine permet de discriminer parmi les patients de type 2 ceux qui ont une interaction augmentée avec la GPIb (type 2B) de ceux qui ont une interaction diminuée (types 2A et 2M).

- **Dosage de la capacité de liaison du VWF au collagène (VWF:CB)**

Ce test mesure la capacité du VWF à se fixer sur des molécules de collagène insolubilisé. Il est sensible à la présence des multimères de HPM et son anomalie reflète, comme le dosage du VWF:RCo, un variant de type 2.

- **Analyse de l'ADN génomique**

La recherche des défauts génétiques du VWF est réalisée par séquençage, après amplification par PCR de l'ADN génomique issu du sang du patient. Il existe un registre des anomalies moléculaires identifiées sur le gène du VWF (mutations et polymorphismes) accessible sur internet (<http://www.sheffield.ac.uk/vwf>).

Dans les **types 1 et 3**, l'identification des défauts génétiques se révèle complexe et difficile étant donné la taille du gène (178 kb). Bien que le **type 1** de la VWD soit le type le plus fréquent, une dizaine d'anomalies seulement avaient été rapportées avant la création du projet européen sur le « diagnostic clinique et moléculaire de la VWD de type 1 », élaboré pour essayer de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce défaut quantitatif. Grâce à ce projet, une soixantaine de nouvelles mutations ont déjà été identifiées dans les 154 familles, originaires de 9 pays européens. Les anomalies moléculaires identifiées dans le **type 3** sont de plusieurs sortes mais il s'agit principalement de délétions du gène (totales, partielles ou ponctuelles), d'insertions ponctuelles ou de codons stop.

Les mutations de **type 2** sont généralement des mutations ponctuelles et leur localisation a permis de montrer l'importance de certains domaines du VWF dans sa fonction (**Figure 3**).

Presque tous les changements nucléotidiques identifiés chez les patients de **type 2B** sont localisés entre les aa 1303 (540) et 1341 (578), au niveau de la boucle du domaine A1 du VWF, région qui contient les sites de liaison pour la GPIb plaquettaire (voir 1^{ère} partie, chapitre 1, publication 1).

Les anomalies moléculaires responsables du **type 2A** siègent, elles, essentiellement au niveau du domaine A2 du VWF qui contient le site de protéolyse en Y1605-M1606 (842-843). Néanmoins, d'autres mutations ont été trouvées dans le propeptide et dans l'extrémité C-terminale du VWF impliqués respectivement dans la multimérisation et la dimérisation de la protéine. Quelques mutations ont aussi été localisées au niveau de la boucle formée par le pont disulfure entre les cystéines 1272 (509) et 1458 (695) du domaine A1 (voir 1^{ère} partie, chapitre 2, publication 2).

Les anomalies moléculaires responsables du **type 2M** sont localisées également dans la boucle du domaine A1 du VWF. Récemment, les anomalies de ce type ont été assez fréquemment identifiées chez les patients du Réseau INSERM (voir 1^{ère} partie, chapitre 3, publication 3).

Dans le **type 2N**, la majorité des anomalies moléculaires responsables du défaut qualitatif du VWF ont été identifiées au niveau du site de liaison au FVIII présent sur l'extrémité N-terminale du VWF (voir 2^{ème} partie).

E – Traitement

La plupart des patients VWD ont une symptomatologie modérée et ne requièrent de traitement qu'à l'occasion d'un traumatisme important ou à titre préventif en cas d'intervention chirurgicale. A l'opposé, dans les formes graves (VWD de type 3), les hémorragies spontanées qui peuvent survenir nécessitent la correction du trouble de l'hémostase primaire (temps de saignement) et de la coagulation (taux de FVIII, ...). Le suivi des patients atteints de la VWD doit se faire dans des centres spécialisés qui sont également généralement ceux du traitement de l'hémophilie.

Il est important pour les malades de VWD, comme pour ceux atteints d'hémophilie, de ne pas consommer de médicaments altérant la coagulation du sang (aspirine, anti-rhumatismaux, Voltarène, Brufen, etc.).

Avant 1984, date du début du traitement par la desmopressine, le plasma puis les cryoprécipités représentaient la seule possibilité thérapeutique. Le plasma apportait tous les facteurs de la coagulation, y compris des protéines totalement inutiles chez le patient atteint de VWD. Le cryoprécipité apportait en plus du VWF d'autres facteurs de coagulation mais c'est surtout la difficulté de le soumettre à un procédé d'inactivation virale, qui a fait qu'il a été remplacé par des concentrés plus purifiés de VWF, plus ou moins riches en FVIII.

Il existe actuellement deux possibilités thérapeutiques majeures : la dDAVP d'une part et les concentrés plasmatiques d'autre part. Le choix dépend du type de VWD, de la réponse à la dDAVP et de la situation clinique.

1 – La desmopressine

La dDAVP est un dérivé synthétique d'une hormone naturelle, la vasopressine. Elle est commercialisée sous le nom de MINIRIN[®] pour la voie intraveineuse et d'OCTIM[®] pour la voie intranasale. Elle est capable de libérer, dans le sang, le VWF stocké dans les cellules endothéliales. L'augmentation rapide (30 min à 2 heures), de 3 à 4 fois le taux basal de VWF s'accompagne d'une augmentation du FVIII et d'une correction du TS. La 1/2 vie du VWF libéré est environ de 6 à 9 heures et celle du FVIII de 4 à 5 heures. L'injection peut être répétée toutes les 12 à 24 heures en fonction de la situation clinique. Cependant, la réponse est de moins en moins efficace liée à l'épuisement des réserves stockées (tachyphylaxie) [Mannucci et coll 1992].

L'utilisation de la desmopressine dans le traitement de la VWD est limitée aux patients n'ayant pas de contre-indication pour cette molécule et possédant un stock suffisant de VWF fonctionnel intracellulaire. Son utilisation nécessite donc la réalisation d'un test préalable pour s'assurer de l'efficacité du traitement. Dans le type 1, la dDAVP est généralement efficace chez les patients ayant un stock endothélial de VWF suffisant, reflété par leur taux de VWF intra-plaquettaire (environ 90% des patients sont bons répondeurs). La desmopressine est inconstamment efficace dans le sous-type 2A (seuls les patients ayant une mutation de groupe 2 étant bons répondeurs) ; elle est contre-indiquée en raison d'aggravation de l'agrégation plaquettaire et de la thrombopénie dans le sous-type 2B et d'efficacité limitée dans le temps dans le sous-type 2N. Elle est inefficace dans le type 3 puisqu'il n'y a aucun stock de VWF disponible.

Il y a très peu d'effets secondaires, à condition de respecter les contre-indications (hypertension artérielle mal corrigée, sujets âgés, enfants de moins de 2 ans) et la restriction hydrique qui s'impose même pour les traitements de durée brève.

Du fait de son absence de risque de transmission virale et de son faible coût, la dDAVP est le traitement de choix des saignements spontanés, après traumatismes minimes ou chirurgie mineure pour les patients répondeurs à cette molécule.

2 – Traitement substitutif

Pour les malades ne répondant pas à la dDAVP ou pour des situations comportant des risques hémorragiques prolongés, il faut avoir recours au traitement transfusionnel par apport de VWF exogène. Les concentrés plasmatiques de VWF contiennent du VWF dont la composition multimérique se rapproche le plus possible du VWF plasmatique ainsi qu'une concentration variable en FVIII. En France, il existe actuellement 2 types de produits :

- le concentré de facteur VIII spécial Willebrand qui contient à la fois du VWF et du FVIII (~ 0,5 unité de FVIII par unité de VWF) (INNOBRANDUO[®])
- le concentré de VWF de très haute pureté qui ne contient pratiquement que du VWF (< 0.1 unité de FVIII par unité de VWF) (facteur WILLEBRAND-LFB[®])

Ces 2 produits fabriqués par le LFB, sont obtenus après de nombreuses étapes de fractionnement et de purification du plasma issu de dons de sang.

Après avoir été une 1^{ère} fois testés au centre de transfusion sanguine pour rechercher par test ELISA, la présence de différents pathogènes (virus des hépatites B et C, du VIH, du germe de la

syphilis), les plasmas sont à nouveau testés au LFB, par biologie moléculaire cette fois, pour le virus des hépatites, le VIH et le parvovirus B19.

Le VWF est purifié à partir de la fraction cryoprécipitable du plasma par chromatographie d'échange d'ions et d'affinité.

Ces concentrés sont traités par solvant-détergent ce qui élimine le risque de transmission de virus à enveloppe lipidique (VIH, virus des hépatites B et C) mais laisse néanmoins persister un risque de transmission de virus nus (hépatite A, parvovirus ..). Récemment une nouvelle génération de Willebrand-LFB appelée WILFACTIN[®] est fabriqué selon un nouveau procédé incluant 2 étapes supplémentaires de sécurisation : une nanofiltration 35 nanomètres et une étape de chauffage à sec.

Ces 2 produits ont, à doses égales, le même effet sur le TS mais différent par leur effet sur la cinétique du FVIII. Le concentré WILLEBRAND-LFB[®] (ou le WILFACTIN[®]) induit une élévation retardée du FVIII endogène dont le taux maximum n'est atteint que 6 à 12 heures après l'injection. Ce temps est nécessaire à la stabilisation de l'activité endogène du FVIII par le VWF injecté. L'INNOBRANDUO[®] induit une élévation immédiate du FVIII avec un pic atteint, comme chez l'hémophile, 15 à 30 minutes après l'injection qui correspond à l'apport exogène du FVIII. Secondairement, le taux de FVIII se stabilise par libération de FVIII endogène. Les patients dont le taux basal de FVIII est >20 % peuvent être traités, dans la plupart des cas, par le Willebrand LFB[®]. Ceux ayant un taux < 20 % peuvent être traités par INNOBRANDUO[®] ou par le Facteur Willebrand purifié associé à du FVIII purifié.

Ces concentrés plasmatiques de VWF sont efficaces dans tous les types de VWD mais, du fait de risques hypothétiques résiduels (transmission de prions ...) et de leur coût élevé, ils doivent être réservés aux patients qui ne peuvent bénéficier d'un traitement par la dDAVP en raison d'une inefficacité, d'une contre-indication ou d'une tachyphylaxie.

III – PRESENTATION DE CE TRAVAIL

Ce mémoire s'articule en 2 parties consacrées à l'étude de VWF présentant des défauts qualitatifs (anomalies moléculaires de type 2).

La **1^{ère} partie** est consacrée à l'étude d'anomalies moléculaires responsables de **défauts de liaison du VWF à la glycoprotéine Ib plaquettaire**.

La **2^{ème} partie** est ciblée sur l'étude d'anomalies moléculaires responsables de **défauts de liaison du VWF au FVIII**.

Une double approche biochimique et moléculaire reposant sur l'étude de plasmas de patients atteints de différents sous-types 2 de la VWD et de VWF recombinant porteurs des anomalies moléculaires nouvellement identifiées chez ces patients a été utilisée pour confirmer la relation phénotype/génotype et l'implication de certains aa du VWF dans sa liaison aux ligands (GPIb, FVIII).

PREMIERE PARTIE

Etude d'anomalies moléculaires responsables de défauts de liaison du VWF à la glycoprotéine Ib plaquettaire

INTRODUCTION

Le VWF, par l'intermédiaire de ses liaisons aux structures sous-endothéliales, en particulier aux collagènes, et à ses récepteurs membranaires plaquettaires (glycoprotéines Ib et IIb/IIIa) joue un rôle primordial dans l'adhésion plaquettaire, l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus, et par voie de conséquence dans l'arrêt du saignement (**Figure 5**).

En conditions physiologiques normales, le VWF n'a pas d'affinité particulière pour les plaquettes. Pour se fixer aux plaquettes, il doit, au préalable, subir une modification de conformation qui passe par son immobilisation à la surface de la matrice extracellulaire sous-endothéliale, ce qui est le cas lors d'une lésion de la paroi vasculaire.

Les composants les mieux étudiés impliqués dans l'« ancrage » du VWF soluble à la matrice extracellulaire sont les collagènes. Le collagène de type I est prévalent dans les couches profondes du vaisseau et, par conséquent, n'est exposé que lors de lésions importantes. Le collagène de type III est localisé dans le sous-endothélium et peut interagir avec le VWF lors de lésions modérées. Le VWF interagit aussi avec le collagène de type VI, autre constituant de la matrice sous-endothéliale. Les sites de liaison du VWF aux collagènes sont situés dans ses domaines A1 et A3. Le **domaine A3** est nécessaire pour la liaison **VWF-collagène fibrillaire de type III ou I** [Sixma et coll 1997] alors que le **domaine A1** semble impliqué dans la liaison au **collagène de type VI** [Mazzucato et coll 1999]. Le domaine A1 contient également des sites de liaison à l'héparine et aux sulfatides qui pourraient intervenir aussi dans cette interaction du VWF avec le sous-endothélium.

I – LIAISON VWF-PLAQUETTES

A – Liaison aux récepteurs plaquettaires

Le VWF attaché aux constituants de la matrice sous-endothéliale se fixe alors par l'intermédiaire de son **domaine A1** au complexe plaquettaire **GPIb/IX/V** (constitué de 4 glycoprotéines: GPIb α , GPIb β , GPIX et GPV). Le site de liaison du VWF sur la GPIb a été identifié au niveau de l'extrémité N-terminale de la GPIb α .

Ces liaisons entre le VWF et la GPIb maintiennent les plaquettes en contact étroit avec les constituants réactifs du sous-endothélium pendant un laps de temps suffisant pour induire leur **activation** qui induira alors leur **adhésion** irréversible. En effet, ces liaisons conduisent à la **transmission** d'un **signal** induisant la mise en conformation **active** du complexe **GPIIb/IIIa** plaquettaire lequel se fixe, à son tour, à d'autres molécules du VWF sous-endothélial ou plasmatique. Ces liaisons induisent l'étalement des plaquettes et leur adhésion irréversible au sous-endothélium, permettant aux plaquettes de ne pas être « balayées » par les taux de cisaillement élevés. Ce thrombus consolidé par la fibrine devient irréversible et constitue le clou hémostatique. Il est à noter que la GPIIb/IIIa a un autre ligand, le fibrinogène. En fonction des concentrations locales

et des taux de cisaillement, l'un ou l'autre ligand permet l'agrégation plaquettaire. A des taux de cisaillement élevés, le VWF serait la seule protéine responsable de la formation des thrombi [Weiss et coll 1989]. Le domaine d'interaction du VWF avec la GPIIb/IIIa est situé dans le domaine C1 du VWF et correspond à la séquence RGD (séquence de 3 aa, arginine, glycine et acide aspartique) spécifique des protéines adhésives, en position 2407-2409 (1644-1646). Il est à noter qu'une autre séquence RGD existe dans le domaine D2 en position 698-700 du pré-pro-VWF.

B – Mesure de l'interaction VWF/GPIb

Il n'est pas facile de mesurer l'interaction entre le VWF soluble et la GPIb plaquettaire même en induisant des forces de cisaillement élevées grâce à des dispositifs mécaniques tels que les viscosimètres et les chambres de perfusion. En effet, la liaison ne devient irréversible et donc mesurable que lorsque l'activation des plaquettes se produit et que la GPIIb/IIIa intervient. Néanmoins, la liaison du VWF à la GPIb plaquettaire peut être rendue irréversible, *in vitro*, en absence de cisaillement, par la présence de modulateurs exogènes dont les 2 plus connus sont la ristocétine et la botrocétine.

La **ristocétine** est une substance à effet antibiotique extraite des bactéries *Nocardia Lurida*. Cette glycoprotéine chargée positivement **se lie** à la fois à la **GPIb** et au **VWF** [Coller et Gralnick 1977 ; Jenkins et coll 1979 ; Scott et coll 1991].

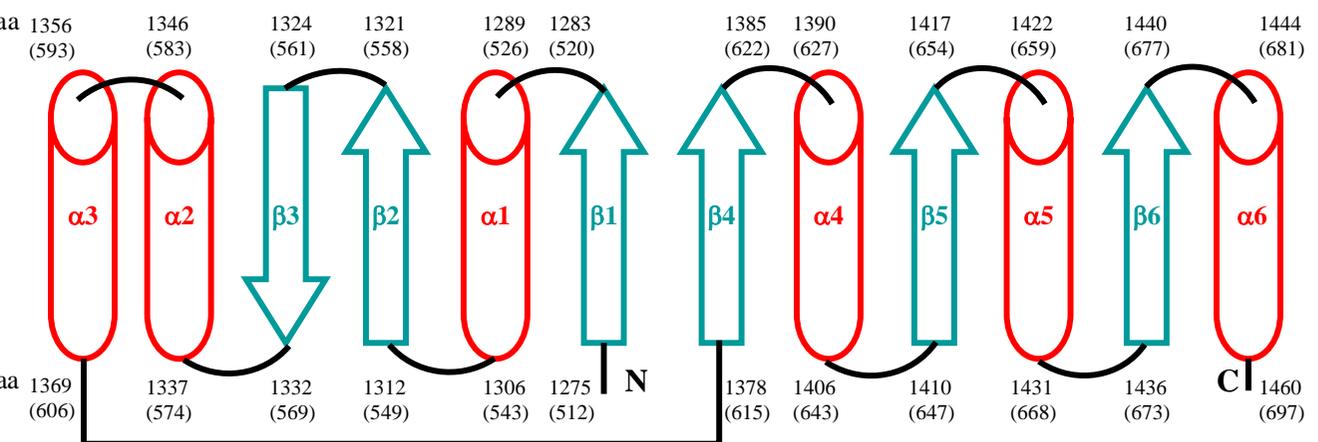
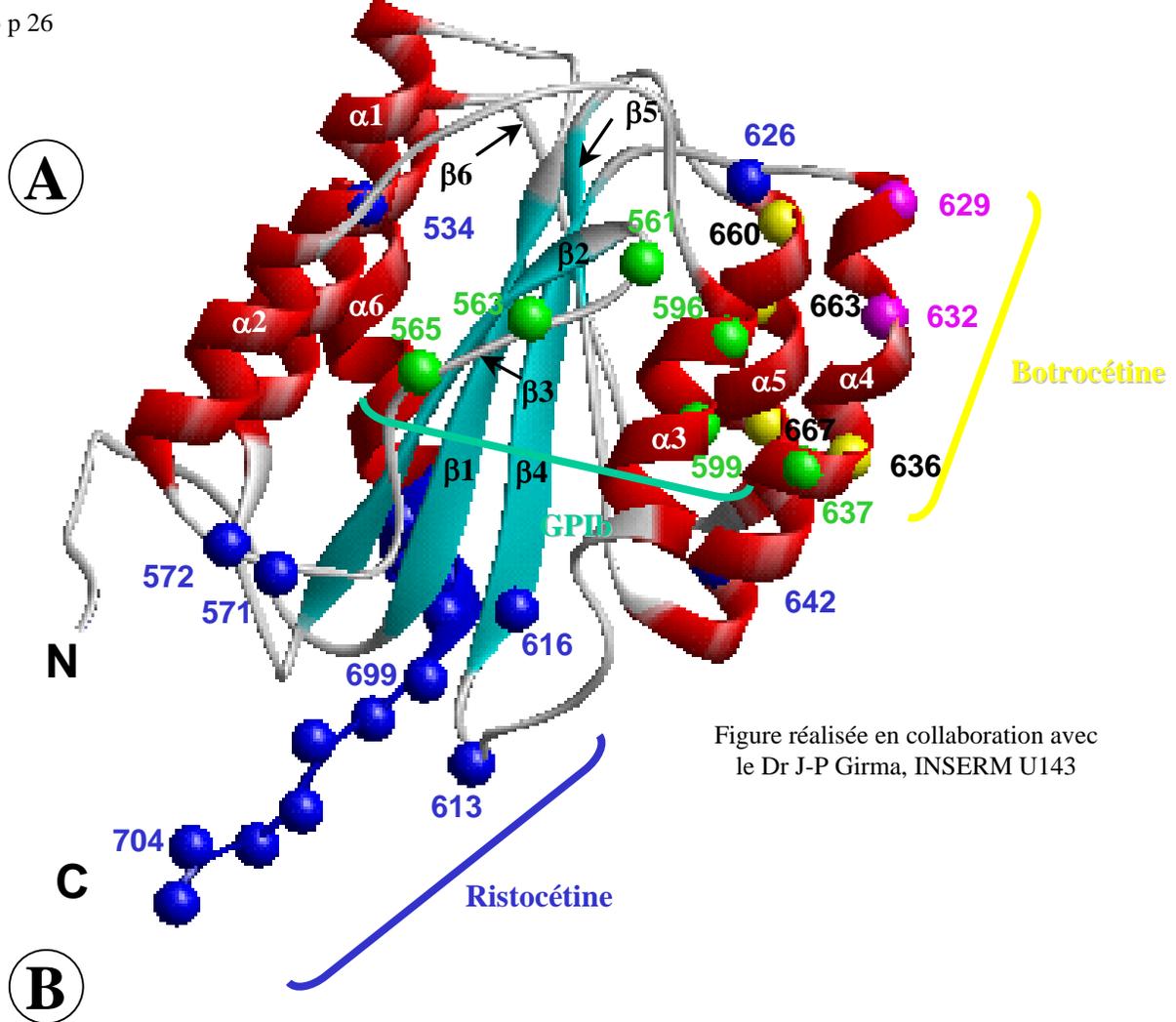
La **botrocétine** est une protéine extraite du venin de vipère *Bothrops jararaca* [Andrews et coll 1989]. Elle existe sous forme monocaténaire ou bicaténaire. La forme bicaténaire est environ 30 fois plus active que la forme monocaténaire pour induire la liaison du VWF à la GPIb [Fujimura et coll 1991]. Cette protéine chargée négativement ne se lie pas à la GPIb mais forme un **complexe avec le VWF**, complexe **qui peut alors se lier à la GPIb** [Read et coll 1978]. L'adhésion des plaquettes à ce complexe est rapidement irréversible.

Un 3^{ème} médiateur, la **bitiscétine**, a été récemment caractérisé. C'est également une protéine de venin (*Bitis arietans*) qui, à l'opposé de la botrocétine, est une protéine basique [Hamako et coll 1996]. La bitiscétine **se lierait au** niveau du **domaine A3** du VWF [Obert et coll 1999] **induisant un changement de conformation** au niveau du **domaine A1** qui exposerait alors un site de liaison pour la GPIb.

Bien que l'action de ces modulateurs ne reproduise probablement aucun mécanisme physiologique, ils permettent d'étudier l'interaction VWF/GPIb et apportent des informations sur la manière dont l'affinité du VWF pour la GPIb peut être modulée lors de la formation du thrombus.

Les tests utilisés en 1^{ère} intention pour étudier la liaison VWF-plaquettes sont les tests d'**agrégation plaquettaire** induite par différentes concentrations de ristocétine. Outre la RIPA étudiant le PRP du patient, les tests peuvent être effectués sur différents mélanges [plasma du patient + plaquettes témoin] ou [plaquettes du patient + plasma témoin] et permettent ainsi de distinguer une anomalie du VWF plasmatique d'une anomalie plaquettaire. Les résultats de l'affinité du VWF plasmatique pour la GPIb, permettent d'affirmer le diagnostic de la VWD de sous-type 2B (lorsque ce test est augmenté aux faibles doses de ristocétine) ou de sous-type 2A ou 2M (lorsque ce test est diminué aux fortes doses de ristocétine).

L'étude de la **liaison du VWF à la GPIb** par la détermination soit du VWF:Ag lié aux plaquettes soit du VWF:Ag résiduel après incubation des plaquettes avec le plasma du patient, **en présence de différentes concentrations de modulateur**, complète les tests d'agrégation et aide à la confirmation du diagnostic.



D'après Varughese et coll 2002

Figure 7 : Structure tridimensionnelle (A) et topologie (B) du domaine A1 du VWF

Le domaine A1 du VWF comprend 6 feuillets β centraux et 6 hélices α .

En vert : aa impliqués dans la liaison à la GPIb

En bleu : aa impliqués dans la liaison à la ristocétine

En jaune : aa impliqués dans la liaison à la botrocétine

En rose : aa impliqués dans la liaison à la botrocétine et à la GPIb

C – Intervention du domaine A1 du VWF dans l'interaction VWF/GPIb

La structure tridimensionnelle du domaine A1 constitué par les aa E1260 à G1479 (Glu497 à Gly716) a été étudiée par cristallographie dès 1998 [Celikel et coll ; Emsley et coll]. Il comprend 6 feuillets β (5 feuillets parallèles et le feuillet β_3 anti-parallèle) au centre de la structure et 6 hélices α (3 de chaque côté des feuillets β centraux) (**Figure 7**). Cette structure est similaire à celle du domaine A3 du VWF et aux domaines de type A d'autres protéines comme les intégrines [Colombatti et Bonaldo 1991]. Mais les domaines A1 et A3 du VWF ne contiennent pas de motif MIDAS (Metal Ion Dependent Adhesion Site) ce qui est en accord avec le fait que la liaison du VWF à la GPIb et aux collagènes est indépendante des cations divalents.

Le fait que le site de liaison du VWF à la GPIb est situé entre les aa 1212 (449) et 1491 (728) du VWF contenant tout le domaine A1 et quelques aa du domaine D3, a été établi il y a plus d'une quinzaine d'années [Titani et coll 1986 ; Fujimura et coll 1986, 1987]. De plus, il a été montré que la délétion du domaine A1 est compatible avec la sécrétion de multimères du VWF (même si une diminution des multimères de HPM est observée) qui sont incapables de se lier aux plaquettes en présence de ristocétine mais restent aptes à se lier au collagène et au FVIII [Sixma et coll 1991] confirmant bien l'implication de ce domaine dans cette liaison.

Depuis différentes études ont été menées pour identifier les aa impliqués dans la liaison à ce récepteur avec des résultats parfois contradictoires. Le domaine du VWF qui se lie à la GPIb a été étudié en utilisant des peptides inhibiteurs [Mohri et coll 1988 ; Sugimoto et coll 1991 ; Berndt et coll 1992], en déterminant les épitopes d'anticorps monoclonaux (Acm) inhibiteurs de cette liaison [Mohri et coll 1988 ; Girma et coll 1990] ou par mutagenèse dirigée (aa chargés du domaine A1 mutés en alanine) [Sugimoto et coll 1993 ; Matsushita et Sadler 1995 ; Matsushita et coll 2000]. Comme ces essais ont été généralement réalisés en utilisant des modulateurs comme la ristocétine et la botrocétine qui ont des mécanismes d'action différents, la signification physiologique de ces travaux reste relative. En effet, les résultats obtenus avec les modulateurs peuvent refléter la liaison VWF/GPIb à des forces de cisaillement faibles peu représentatives des conditions de la circulation sanguine.

Néanmoins, les résultats (**Figure 7**) suggèrent que :

Les résidus G1324 (Gly561), H1326 (His563), Y1528 (Tyr565) et particulièrement E1359 (Glu596), K1362 (Lys599) et Y1400 (Tyr637) semblent jouer un rôle prépondérant avec le récepteur **GPIb** [Vasudevan et coll 2000]. L'implication possible de E1359 (596), K1362 (599) et Y1400 (637) avait déjà été suggérée [Matsushita et Sadler 1995]. Ainsi, la conformation de la région autour de l'hélice α_3 semble être primordiale.

La **ristocétine** interagirait avec les séquences négatives riches en proline flanquant la boucle A1 ie sur les bras N- et C-terminaux de ce domaine : séquences 1237-1251 (474-488) et 1457-1471 (694-708) [Berndt et coll 1992 ; Azuma et coll 1993a]. Récemment, il a été montré que la liaison du VWF à la GPIb induite par la ristocétine est spécifiquement affectée par les substitutions en positions K1297 (Lys534), R1334 (Arg571), K1335 (Lys572), E1359 (Glu596), E1376 (Glu613), E1389 (Glu626) et K1405 (Lys642) [Matsushita et coll 2000].

La liaison induite par la **botrocétine** est diminuée sélectivement par les mutations R1392 (Arg629), R1395 (Arg632), R1399 (Arg636) et K1430 (Lys667) [Varughese et coll 2002 ; Matsushita et coll 2000]. De plus, l'utilisation d'un Acm inhibiteur de la liaison directe de la botrocétine au VWF indique que les résidus K1423 (Lys660) et R1426 (Arg663) sont aussi impliqués dans cette liaison [Matsushita et coll 2000]. La liaison à la botrocétine implique donc des résidus sur les hélices α_4 et α_5 .

Les substitutions des résidus R1392 (Arg629) et R1395 (Arg632) affectent la liaison par les 2 agonistes [Matsushita et coll 2000].

II – RELATION PHENOTYPE – GENOTYPE CHEZ LES PATIENTS PRESENTANT DES DEFAUTS DE LIAISON DE LEUR VWF A LA GPIb PLAQUETTAIRE

Les anomalies moléculaires du VWF situées dans son domaine A1 de liaison à la GPIb plaquettaire ont pour conséquence un **syndrome hémorragique** caractérisant certains variants de VWD. L'étude de l'**agrégation plaquettaire** induite par différentes concentrations de ristocétine et celle de la **liaison du VWF plasmatique à la GPIb**, en présence de ristocétine et/ou de botrocétine permettent de **différencier** les patients présentant une affinité accrue pour la GPIb plaquettaire (**sous-type 2B**) de ceux présentant une affinité diminuée pour ce récepteur (**sous-types 2A ou 2M**).

L'étude complémentaire de la **répartition des multimères** du VWF, par électrophorèse en SDS-agarose est aussi une étape importante du diagnostic des patients présentant une anomalie de liaison à la GPIb plaquettaire. Elle permet de différencier le sous-type 2A du sous-type 2M lorsqu'une diminution d'affinité pour la GPIb a été mise en évidence chez le patient. Le sous-type 2A VWD est caractérisé par une distribution anormale des multimères avec, en particulier, l'absence de multimères de HPM alors que le sous-type 2M VWD présente une répartition multimérique normale. Tout comme le sous-type 2A VWD, le sous-type 2B VWD est caractérisé par une distribution anormale des multimères, conséquence de l'affinité accrue des multimères de HPM pour les plaquettes.

L'extrême hétérogénéité clinique et biologique de la VWD a rendu indispensable sa classification. Cette classification n'est pas seulement « académique » mais aussi pratique puisque le diagnostic conditionne la démarche à suivre pour la recherche de l'anomalie moléculaire responsable de la fonction anormale du VWF et le traitement. En effet, la localisation des domaines fonctionnels sur la sous-unité mature du VWF a permis de cibler la recherche des mutations aux exons codant pour ces séquences. Ainsi, pour **des patients présentant des défauts de liaison à la GPIb plaquettaire**, le **séquençage de l'exon 28** du gène du VWF doit être systématiquement entrepris. Comme il existe un pseudo-gène, duplication partielle du segment compris entre l'exon 23 et l'exon 34 du gène du VWF, il faut en tenir compte pour éviter des erreurs d'analyse [Ginsburg et coll 1985] et choisir des amorces spécifiques pour l'amplification de cet exon 28, par PCR à partir de l'ADN génomique du patient.

Lorsqu'une nouvelle anomalie moléculaire est identifiée, son expression est réalisée pour confirmer ou non la corrélation entre cette mutation et l'anomalie fonctionnelle et éventuellement structurale du VWFr muté.

Ainsi mon travail sur les défauts de liaison du VWF aux plaquettes s'est déroulé en étapes successives parmi lesquelles

- l'identification d'anomalies moléculaires du gène du VWF
- la construction de vecteurs d'expression contenant l'ADNc du VWF porteur d'anomalies encore non rapportées
- l'expression transitoire de VWFr mutés, dans des cellules eucaryotes
- et enfin l'analyse structurale et fonctionnelle de ces VWFr mutés comparée à celle de VWFr normal (WTVWFr).

A – Construction de vecteur d’expression muté

La construction du vecteur portant l’ADNc muté du VWF se fait, par **mutagenèse dirigée** selon des techniques basées sur la PCR et l’emploi d’amorces spécifiques (technique de Mikaelian et Sergeant 1992 ou utilisation de kits commerciaux). Un fragment d’ADNc muté, issu de la digestion du vecteur par 2 enzymes de restriction uniques, est ensuite **sous-cloné**, après vérification de sa séquence, dans le vecteur final qui est amplifié et purifié à l’aide de kits commerciaux de préparations plasmidiques.

B – Expression de VWF recombinant muté

Le vecteur muté final est **transfecté de façon transitoire** dans des cellules de rein de singe (cellules Cos-7) par la technique au DEAE dextran. Les faibles quantités de VWFr obtenues (~ 1 µg/ml de milieu de culture) nous ont amené à renoncer à les purifier et nous avons dû parfois concentrer ces milieux de culture, sur Aquacid, pour réaliser nos analyses structurales et fonctionnelles.

L’analyse structurale des VWFr a été réalisée en gel SDS-agarose et la capacité du VWFr muté à interagir *in vitro* avec la GPIb plaquettaire a été évaluée en présence et en l’absence de ristocétine et de botrocétine.

La partie de ce travail consacrée à l’étude des anomalies moléculaires responsables de défauts de liaison du VWF à la GPIb plaquettaire présente les phénotypes et génotypes de quelques patients appartenant à 3 sous-types qualitatifs de la VWD, et les résultats de l’expression des nouvelles mutations identifiées chez ces patients, recherches qui illustrent bien les multiples aspects fonctionnels du VWF.

Cette 1^{ère} partie s’articule en 3 chapitres :

- Le 1^{er} chapitre concerne l’identification et l’expression de 4 mutations de type 2B VWD, dont deux sont localisées dans la boucle du domaine A1 du VWF, R1306W (543) et V1316M (553) et deux en dehors de cette boucle, L1460V (697) et A1461V (698) (**publication n° 1**).
- Le 2^{ème} chapitre concerne l’identification et l’expression de 2 anomalies moléculaires, R1374C et R1374H (611) qui, bien que localisées dans le domaine A1 du VWF, induisent une diminution de la capacité du VWF (plasmatique et recombinant) à se lier à la GPIb plaquettaire (**publication n° 2**).
- Le dernier chapitre concerne l’identification et l’expression d’une anomalie moléculaire de type 2M VWD, G1324A (561) responsable d’une liaison diminuée du VWF à la GPIb en présence de ristocétine mais normale en présence de botrocétine (**publication n° 3**).

CHAPITRE I

Identification et expression d'anomalies moléculaires de type 2B VWD

RAPPEL

Le sous-type 2B VWD fait référence aux variants « qualitatifs » caractérisés par une augmentation de l'affinité du VWF pour la GPIb plaquettaire, exprimée *in vitro* par l'augmentation de sensibilité à la ristocétine. Cette anomalie fonctionnelle aurait pour conséquence la perte des multimères de HPM du VWF plasmatique, caractéristique structurale de ce variant. En effet, le VWF plasmatique de type 2B se lie aux plaquettes avec une telle affinité qu'il occupe, en conditions de circulation normales, une partie des récepteurs GPIb plaquettaires. Ces liaisons VWF/GPIb induisent la formation de microagrégats qui conduisent à l'élimination des plaquettes impliquées dans ces agrégats provoquant parfois des thrombopénies sévères chroniques ou intermittentes. Chez ces patients, la présence d'un syndrome hémorragique et non thrombotique s'expliquerait non seulement parce que les multimères de HPM sont diminués ou absents du plasma mais aussi parce que certains des récepteurs GPIb sont occupés par le VWF soluble et sont ainsi incapables d'interagir avec le VWF immobilisé sur les tissus endommagés.

Le domaine de liaison du VWF à la GPIb est situé dans son domaine A1 codé par l'exon 28 [aa 1226 à 1684 (463-921)]. On dispose ainsi d'un fil conducteur pour la recherche de mutations responsables de ce phénotype particulier. De plus, comme la majorité des mutations de type 2B VWD ont été identifiées entre les aa 1303 (540) et 1341 (578) du domaine A1, c'est la partie 5' de cet exon qui est séquencée en premier pour l'analyse du génotype de ce type de patient. Lorsqu'aucune anomalie moléculaire n'est identifiée dans cette zone, comme dans la publication ci-dessous, le reste de l'exon 28 doit être séquencé.

PUBLICATION N° 1 : *Hilbert L, Gaucher C, Mazurier C. Effects of different amino-acid substitutions in the leucine 694-proline 708 segment of recombinant von Willebrand factor. Br J Haematol 1995, 91: 983-990*

A – Caractérisation du phénotype du patient

Le propositus est une femme de 58 ans (à l'époque de l'étude) présentant des symptômes hémorragiques sévères (hémorragies après avulsions dentaires, accouchements et opérations chirurgicales, ménorragies ...) nécessitant des transfusions sanguines à plusieurs reprises. Le diagnostic de VWD de type 2B est basé sur un TS augmenté, une thrombopénie, des taux de VWF et de FVIII normaux. Son PRP agglutine en présence de 0,25 mg/ml de ristocétine, dose n'induisant pas l'agglutination de plasma normal. De plus, la liaison du VWF plasmatique de cette patiente aux plaquettes est augmentée, *in vitro*, en présence de faibles doses de ristocétine confirmant l'hyperaffinité du VWF plasmatique pour la GPIb plaquettaire. L'étude de la répartition des multimères du VWF plasmatique par électrophorèse SDS-agarose montre l'absence des multimères de HPM. Six membres apparentés présentent également une RIPA augmentée aux faibles doses de ristocétine, indiquant qu'ils sont eux aussi affectés par la VWD de type 2B.

B – Caractérisation du génotype du patient

L'étude des fragments d'ADN, après amplification par PCR de la partie 5' de l'exon 28 du gène du VWF de la patiente, a permis l'identification d'une anomalie moléculaire C→T en position 4382 ayant pour conséquence la substitution A1461V (Ala698Val sur la sous-unité mature du VWF). La patiente est hétérozygote pour cette nouvelle mutation qui n'est pas située dans la région de la boucle du domaine A1 où sont décrites habituellement les mutations caractérisant la VWD de type 2B. Les patients apparentés présentant une RIPA anormale qui ont été analysés, en biologie moléculaire, sont également porteurs de cette nouvelle anomalie moléculaire à l'état hétérozygote.

C – Etude de VWF recombinant mutés

Il était d'autant plus important d'exprimer cette mutation candidate (A1461V) (698) qu'elle était située en dehors de la boucle du domaine A1 formée par les cystéines 1272 et 1458 (509 et 695) connue pour son implication dans le sous-type 2B VWD. L'expression transitoire dans des cellules Cos-7 du recombinant correspondant a permis de le comparer au WTVWFr et également à 2 autres VWFr porteurs de mutations fréquemment identifiées dans la boucle du domaine A1 : **R1306W** et **V1316M** (Arg543Trp et Val553Met).

La structure multimérique de ces 3 recombinants mutés est normale avec la présence des multimères de HPM et comparable à celle du WTVWFr.

Les tests *in vitro*, montrent que les 3 recombinants mutés présentent une hyperaffinité pour la GPIb, se liant à ce récepteur plaquettaire même en absence de ristocétine ou de botrocétine, à l'inverse du recombinant normal qui nécessite la présence d'un inducteur pour se lier aux plaquettes. Mais le pourcentage de cette liaison « spontanée » est variable selon la position de la mutation par rapport à la boucle du domaine A1. Alors que les recombinants porteurs des mutations R1306W (543) et V1316M (553) (situées dans la boucle du domaine A1) montrent un % de liaison spontanée de 12 et 22%, respectivement, le recombinant porteur de la mutation A1461V (698) (située à l'extérieur de cette boucle bien qu'à proximité immédiate) montre un % de liaison spontanée inférieur à 5%. Ce pourcentage est similaire à celui observé avec le recombinant porteur de la mutation L1460V (Leu697Val) rapportée sur l'aa voisin, induisant également l'apparition d'une valine [Hilbert et coll 1994]. Pour examiner l'impact de la présence de résidus valine dans cette région avoisinante de la boucle, nous avons muté en valine, les résidus leucine en position 1457 (694) et 1469 (706) et l'alanine en position 1464 (701). Alors que V1464rVWF présente une liaison à la GPIb plaquettaire augmentée en présence de ristocétine, V1457rVWF et V1469rVWF présentent une liaison diminuée, indiquant que ce n'est pas toujours la présence d'un résidu valine dans cette région qui peut expliquer l'augmentation d'affinité de VWF pour la GPIb.

D – Conclusion

La caractéristique du VWF de type 2B étant son affinité accrue pour la GPIb plaquettaire, l'étude du VWFr muté en A1461V (698) a permis de confirmer la corrélation étroite entre cette nouvelle mutation et l'anomalie fonctionnelle de ce VWF. De plus, la structure multimérique normale de ce recombinant muté confirme que la disparition des multimères de HPM dans le plasma des patients est directement liée à l'hyperaffinité du VWF muté pour la GPIb, et à la formation *in vivo* de complexes VWF/plaquettes. En conclusion, la mutation **A1461V** (698) est bien une **mutation de type 2B VWD**.

Ce travail a également permis de confirmer qu'une modification de la séquence en aa autour de la boucle du domaine A1, et non seulement dans cette boucle, peut conférer au VWF une augmentation de sa capacité à interagir avec la GPIb plaquettaire.

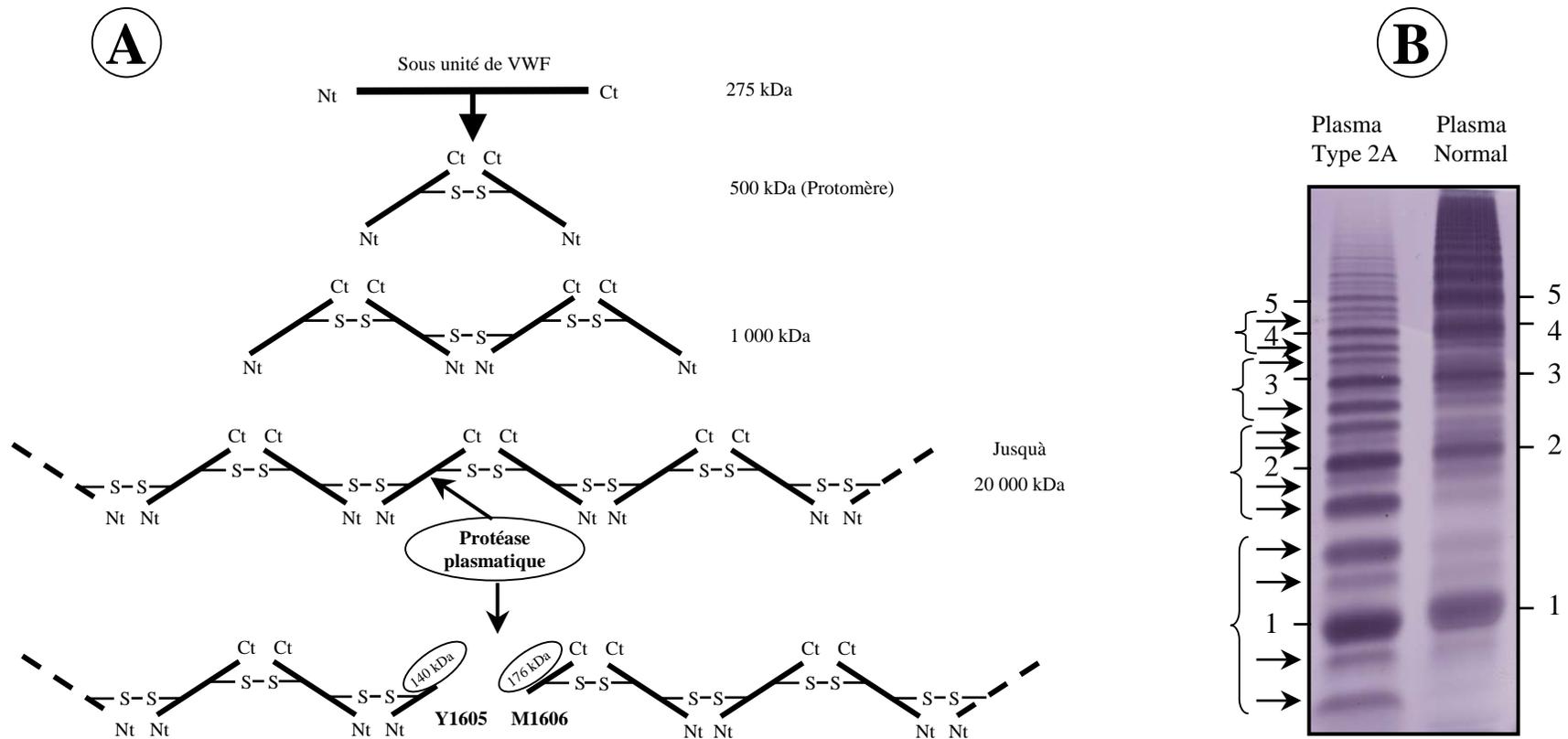


Figure 8 : Protéolyse du VWF plasmatique.

A - Représentation schématique de la protéolyse physiologique du VWF par la protéase plasmatique ADAMST13.

Les sous-unités de VWF se dimérisent par des ponts disulfures C-terminaux pour former des protomères, qui se multimérisent alors par des ponts disulfures N-terminaux pour former des multimères. La protéase plasmatique spécifique du VWF coupe les multimères de manière aléatoire entre la tyrosine 1605 (842) et la Methionine 1606 (843) générant des multimères de plus petit poids moléculaire dont les extrémités sont constituées de fragments de sous-unités N-terminaux de 140 kDa et C-terminaux de 176 kDa.

B - Dans certains sous-types 2A VWD, cette protéolyse physiologique est augmentée induisant un profil multimérique particulier du patient en comparaison au profil du plasma témoin. Les chiffres correspondent aux différents multimères du VWF composés de sous-unités intactes, les flèches indiquent la position des bandes satellite générées par la protéolyse.

CHAPITRE II

Identification et expression d'anomalies moléculaires de type 2A VWD ou de type 2 indéterminé

RAPPEL

Le VWF est une glycoprotéine présente dans le plasma sous la forme d'une population hétérogène de multimères, comprenant un nombre variable de sous-unités (de 2 à une centaine). La perte des multimères de HPM entre les secteurs cellulaires (plaquettes, cellules endothéliales) et plasmatique est liée à une protéolyse physiologique du VWF, les formes de plus BPM résultant en partie d'une dégradation protéolytique des formes de plus HPM [Zimmerman et coll 1986]. Le site principal de protéolyse du VWF est situé dans le domaine A2 du VWF, au niveau de la liaison peptidique Y1605 (Tyr842) et M1606 (Met843) [Dent et coll 1990]. Cette protéolyse physiologique clive, en conditions normales de circulation, des dimères en fragments N-terminaux de 140 kDa et C-terminaux de 176 kDa, fragments qualifiés de «fragments de protéolyse» ou «bandes satellites» de chaque multimère qui sont retrouvés en faible proportion dans le plasma normal (**Figure 8**). L'enzyme responsable de cette protéolyse appelée ADAMTS13 a été purifiée à partir du plasma humain en 1996 [Furlan et coll ; Tsai] et son gène a été identifié en 2001 [Fujikawa et coll ; Gerritsen et coll]. Chez certains patients affectés par le purpura thrombotique thrombopénique (PTT), la taille des multimères du VWF plasmatique est similaire à celle observée normalement dans les organelles de stockage du fait que ces patients sont déficients en cette activité protéolytique.

Le **sous-type 2A** VWD regroupe les variants « qualitatifs » caractérisés par une diminution de l'affinité du VWF pour les plaquettes associée à l'absence des multimères de HPM et de IPM. De plus, chez ces patients, les fragments de protéolyse sont présents en proportion supérieure à la normale et sont un des éléments favorisant la classification de ces patients (**Figure 8**).

Deux mécanismes physiopathologiques différents responsables de ce sous-type ont été mis en évidence [Lyons et coll 1992]:

- Dans le **groupe 1**, la perte des multimères de HPM résulte d'un **défait de synthèse** et/ou de transport intracellulaire du VWF.
- Dans le **groupe 2**, la maturation du VWF est normale comme en témoigne le VWF stocké dans les plaquettes et dans les cellules endothéliales et la perte des multimères de HPM dans le plasma résulte d'une **sensibilité accrue** du VWF à la **protéase**.

La majorité des mutations responsables du sous-type 2A ont été identifiées entre les aa 1505 (742) et 1672 (909) encadrant le site de clivage protéolytique du domaine A2. Cette localisation incite à séquencer en 1^{er} lieu la région 3' de l'exon 28 du gène du VWF pour rechercher les anomalies moléculaires responsables du phénotype 2A VWD. Quelques mutations ont été identifiées dans le domaine A1 du VWF dont certaines induisent un phénotype 2A VWD chez le patient mais leur expression indique qu'elles sont en réalité de sous-type 2B [Azuma et coll 1993b ; Ribba et coll 1994 ; Gaucher et coll 1995]. C'est pourquoi, la partie 5' de l'exon 28 est séquencée en 2^{ème} lieu lorsqu' aucune anomalie moléculaire n'est identifiée dans la partie 3' de cet exon. Plus récemment, certaines mutations dont celles présentées dans l'article ci-dessous ont été identifiées

dans le domaine A1 du VWF et leur expression indique qu'elles induisent comme chez le patient une diminution de capacité du VWF à se lier à la GPIb plaquettaire. Enfin, quelques mutations responsables de particularités structurales du VWF ont été identifiées dans le propeptide [Gaucher et coll 1994, 1998 ; Schneppenheim et coll 1995] et dans la région C-terminale du VWF [Schneppenheim et coll 1996 ; Enayat et coll 2001]. Les exons 11 à 15 et 50 à 52 du gène du VWF doivent donc être séquencés lorsqu' aucune anomalie moléculaire n'a été identifiée dans l'exon 28 du gène du VWF.

PUBLICATION N° 2 : *Hilbert L, Gaucher C, Mazurier C. Identification of two mutations (Arg611Cys and Arg611His) in the A1 loop of von Willebrand factor (vWF) responsible for type 2 von Willebrand disease with decreased platelet-dependent function of VWF. Blood 1995, 86: 1010-101*

A – Caractérisation du phénotype des patients

Cette étude a été réalisée chez les patients de 3 familles non apparentées. Tous les patients affectés ont des caractéristiques communes incluant un TS allongé, des taux de VWF diminués avec des taux de VWF:Ag supérieurs à ceux de VWF:RCo, une RIPA très nettement diminuée à 1 mg/ml de ristocétine. La capacité du VWF plasmatique à se lier *in vitro* à la GPIb plaquettaire est diminuée dès les concentrations de 0,4 mg/ml de ristocétine. En présence de botrocétine, cette liaison est aussi diminuée.

Le pourcentage de multimères ≥ 5 mères du VWF plasmatique des propositi des 3 familles est diminué en comparaison à celui observé pour le plasma normal alors que le taux de protomère est conjointement augmenté. Mais à l'opposé des profils multimériques obtenus avec des plasmas de patients de sous-type 2A VWD « classique », tous les patients montrent la présence de multimères de IPM et les bandes satellites de chaque multimère ne présentent pas l'augmentation d'intensité caractéristique de ce sous-type.

B – Caractérisation du génotype des patients

L'étude des fragments d'ADN, après amplification par PCR de l'exon 28 du gène du VWF de patients appartenant aux 3 familles, a permis l'identification de 2 anomalies moléculaires situées sur le même codon arginine 1374 du VWF (arginine 611). Dans la 1^{ère} famille, la transition C→T en position 4120 induit la mutation candidate R1374C (Arg611Cys) alors que dans les 2 autres familles, c'est la transition G→A en position 4121 qui induit la mutation R1374H (Arg611His).

Les 3 propositi sont hétérozygotes pour ces mutations candidates qui sont localisées dans la boucle du domaine A1 du VWF. L'étude familiale n'a pu être réalisée que dans les familles affectées par la mutation R1374H, les échantillons de sang n'étant pas disponibles pour les apparentés de la 1^{ère} famille.

C – Etude de VWF recombinants mutés

L'expression transitoire, par des cellules Cos-7, des VWF_r porteurs des mutations R1374C (Arg611Cys) et R1374H (Arg611His) est diminuée, la diminution étant plus marquée pour le recombinant R1374C (42% par rapport au taux d'expression du recombinant normal pour R1374C et 68% pour R1374H).

La structure multimérique de ces 2 recombinants est anormale avec une diminution des multimères de HPM bien que légère pour R1374H, corrélée à une augmentation du pourcentage du protomère. Le « smear » observé dans le profil multimérique du recombinant R1374C est probablement lié à la présence de la cystéine surnuméraire induite par la mutation et qui perturbe la conformation tridimensionnelle de la protéine.

Les tests *in vitro* montrent que la capacité de ces 2 recombinants à fixer la GPIIb plaquettaire est affectée que ce soit en présence de ristocétine ou de botrocétine, la capacité à se lier étant quasiment nulle en présence de ristocétine.

Les recombinants hybrides résultant de cotransfection volume à volume des vecteurs d'expression muté et normal, exprimés pour reproduire la protéine hétérogène présente dans le plasma des patients hétérozygotes pour l'anomalie, montrent des résultats intermédiaires entre ceux du recombinant muté et ceux du recombinant normal.

D – Conclusion

L'étude des 2 VWFr mutés R1374C (Arg611Cys) et R1374H (Arg611His) a permis de confirmer la corrélation étroite entre ces mutations, l'anomalie fonctionnelle du VWF plasmatique et la diminution des multimères de HPM. Bien que localisées dans le domaine A1 du VWF, ces mutations n'induisent pas une augmentation de la capacité du VWF à se lier à la GPIIb plaquettaire mais bien, comme les mutations de sous-type 2A, une diminution de cette capacité. En outre, ces mutations sont responsables d'un défaut dans la structure multimérique du VWFr, défaut plus marqué pour la mutation R1374C induisant la présence d'une cystéine supplémentaire. Mais comme le VWF plasmatique de nos patients ne présente ni la diminution marquée des multimères de HPM et de IPM, ni l'augmentation des fragments de protéolyse, caractéristiques du sous-type 2A, ces patients sont difficiles à classer dans ce sous-type. C'est pour cette raison qu'ils ont été classés simplement en type 2 indéterminé. Cette étude est une des 1^{ères} études soulignant la difficulté de classification de certains patients. En 2001, nous avons identifié, dans 5 familles du Réseau INSERM, la mutation R1315C (Arg552Cys) localisée aussi dans le domaine A1 du VWF que nous avons classé en type 2A-like pour des raisons similaires [Ribba et coll 2001]. Il est à noter que la substitution de ces 2 aa en alanine, R1374A (Arg611Ala) et R1315A (Arg552Ala), induit une diminution de liaison de ces recombinants à 6 Acm dont la liaison au VWF est dépendante de sa conformation suggérant que ces substitutions induisent une anomalie structurale significative du domaine A1 [Matsushita et coll 2000]. Les mutations que nous avons identifiées à ces positions induisent probablement le même type d'altération conformationnelle du domaine A1.

CHAPITRE III

Identification et expression d'anomalies moléculaires de type 2M VWD

RAPPEL

Le sous-type 2M VWD comprend les variants « qualitatifs » présentant une diminution d'interaction avec les plaquettes non liée à l'absence de multimères de HPM. Ce sous-type comprend en particulier le **sous-type appelé autrefois « B »** caractérisé par une diminution d'affinité du VWF pour la GPIb en présence de ristocétine mais une affinité normale pour la botrocétine. La mutation G1324S a été identifiée sur le gène du VWF du patient affecté par ce sous-type [Rabinowitz et coll 1992]. Depuis ce 1^{er} cas, d'autres mutations dont celle de cette publication ont été publiées et/ou rapportées dans la banque de données [Hillery et coll 1998]. Dans cette classification de type 2M VWD sont aussi répertoriées des mutations induisant une multimérisation normale mais une capacité du VWF à se lier à la GPIb diminuée en présence des 2 agonistes ristocétine et botrocétine. Ces mutations sont aussi situées dans le domaine A1 du VWF [Mancuso et coll 1996 ; Hillery et coll 1998 ; Hilbert et coll 2000]. Récemment, quelques mutations classées en sous-type 2M et localisées dans le domaine A1 du VWF ont été entrées dans la banque électronique de données mais l'expression permettant la confirmation de la classification reste à réaliser. Sur la base de la position des mutations rapportées dans ces travaux, le **séquencage** de l'**exon 28** est entrepris en 1^{ère} intention pour les variants de **type 2M**.

Les patients atteints du **sous-type « Vicenza »** sont aussi classés dans le sous-type 2M. Ces variants sont caractérisés par un déficit profond et parallèle en VWF:RCo et VWF:Ag et surtout par la présence de multimères de poids moléculaire supérieur à la normale [Mannucci et coll 1988]. La mutation R1205H (Arg442His) localisée dans le domaine D3 du VWF, a été d'abord décrite chez les patients italiens affectés par ce phénotype et chez des patients allemands [Schneppenheim et coll 2000]. Les différents mécanismes impliqués dans ce type de VWD ne sont pas encore clairement élucidés. Une diminution de sensibilité du variant « Vicenza » à la protéolyse semblerait être responsable de la présence des multimères supranormaux dans le plasma.

PUBLICATION N° 3 : *Hilbert L, Fressinaud E, Ribba AS, Meyer D, Mazurier C and the INSERM network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. Identification of a new type 2M von Willebrand disease mutation also at position 1324 of von Willebrand factor. Thromb Haemost 2002, 87: 635-640.*

A – Caractérisation du phénotype du patient

Le propositus est une femme de 26 ans (à l'époque de l'étude) ayant été diagnostiquée comme atteinte de VWD à l'âge de 8 ans. Elle présente des symptômes hémorragiques sévères (épistaxis, ménorragies ...). Elle a été traitée par du concentré de VWF (LFB) avant l'accouchement de son fils. Le diagnostic de VWD de type 2M de la patiente est basé sur un TS augmenté, une RIPA nulle en présence de 1,2 mg/ml de ristocétine et une liaison du VWF plasmatique aux plaquettes nulle en présence de ristocétine mais normale en présence de botrocétine. Alors que le

taux de VWF:Ag est modérément diminué chez cette patiente, l'activité VWFR:Co est quasi nulle (<3 UI/dl). La répartition des multimères du VWF plasmatique est normale.

La sœur de cette patiente présente un bilan clinique similaire. Le père et le fils de la patiente ont des taux de VWF:Ag normaux avec une discordance entre antigène et activité du VWF caractéristique des types 2. La liaison de leur VWF plasmatique à la GPIb plaquettaire est modérément diminuée en présence de ristocétine et normale en présence de botrocétine. La mère de la patiente avec des taux de VWF diminués présente un VWF normalement fonctionnel en présence des 2 agonistes indiquant qu'elle n'est pas atteinte de la forme 2M de la VWD.

B – Caractérisation du génotype du patient

L'étude des fragments d'ADN, après amplification par PCR de la partie 5' de l'exon 28 du gène du VWF de la patiente, a permis l'identification d'une anomalie moléculaire G→C en position 3971 ayant pour conséquence la substitution G1324A (Gly561Ala). La patiente est hétérozygote non seulement pour cette mutation candidate mais aussi pour un codon stop en position 2470 (1707). En effet, comme la liaison à la ristocétine du VWF plasmatique de la patiente était nulle alors que la mutation G1324A (561) était identifiée à l'état hétérozygote, une seconde anomalie moléculaire a été suspectée. Cette hypothèse était renforcée par le taux diminué du VWF:Ag suggérant la présence d'une anomalie quantitative du VWF. Ainsi la patiente est **double hétérozygote** pour une **anomalie qualitative (G1324A)** (Gly561Ala) et une **anomalie quantitative (Q2470X)** (Gln1707ter) du VWF. La sœur de la patiente est porteuse également de ces 2 anomalies alors que son père et son fils ne sont porteurs que de l'anomalie qualitative, à l'état hétérozygote.

C – Etude de VWF recombinant muté

L'expression transitoire, par des cellules Cos-7, du VWFr porteur de la mutation G1324A (Gly561Ala) est normale tout comme la structure multimérique de ce recombinant.

Les tests *in vitro* montrent que la capacité de ce recombinant à fixer la GPIb plaquettaire en présence de ristocétine est nulle alors qu'elle est normale en présence de botrocétine. Le recombinant issu de transfection volume à volume avec le vecteur muté et le vecteur normal, exprimé pour reproduire la protéine hétérogène présente dans le plasma du père et du fils de la patiente, montre une capacité à se lier à la GPIb en présence de ristocétine modérément diminuée, en accord avec les résultats du VWF plasmatique de ces patients.

D – Conclusion

La caractéristique du VWF de type 2M, de sous-type « B » étant son affinité diminuée pour la GPIb plaquettaire en présence de ristocétine mais normale en présence de botrocétine, l'étude du VWFr muté en G1324A (561) a permis de confirmer la corrélation étroite entre cette nouvelle mutation et l'anomalie fonctionnelle de ce VWF. En conclusion, la mutation **G1324A** est bien une **mutation de type 2M sous-type B VWD**.

L'identification de 2 substitutions différentes sur le même aa (G1324A et G1324S) chez des patients présentant un phénotype similaire (multimères normaux, liaison à la GPIb diminuée en présence de ristocétine mais normale en présence de botrocétine) et le fait que cet aa soit conservé dans 28 espèces de Mammifères étudiées [Jenkins et coll 1998] montrent que cet aa est crucial pour les propriétés fonctionnelles du VWF. Récemment, Schulte et coll [2003] ont évalué l'impact de la substitution G1324H (Gly561His) et ont confirmé l'effet différentiel de la ristocétine et de la botrocétine comme observé avec les 2 mutations précédentes.

CONCLUSION SUR LES MUTATIONS DE TYPE 2, LOCALISEES DANS LE DOMAINE A1 DU VWF ET INDUISANT UN DEFAUT DE LIAISON DU VWF A LA GPIb PLAQUETTAIRE

Le VWF a une fonction essentielle au cours de l'hémostase primaire. Il permet l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium exposé et la formation du clou hémostatique. Cette propriété résulte de la présence de multiples domaines fonctionnels sur sa sous-unité mature, chacun interagissant soit avec un constituant du sous-endothélium soit avec un récepteur plaquettaire lui permettant de former un pont entre le sous-endothélium exposé et les plaquettes.

Un changement de conformation du VWF semble être le facteur essentiel pour cette fonction et permet d'expliquer l'absence de liaison entre le VWF et les plaquettes non activées dans la circulation plasmatique. *In vivo*, il est admis que le changement de conformation du VWF est induit par sa liaison au sous-endothélium [Bolhuis et coll 1981]. *In vitro*, divers agonistes comme la ristocétine et la botrocétine permettraient au VWF de changer de conformation lui donnant alors la possibilité d'interagir avec la GPIb à la surface des plaquettes. La ristocétine se lie aux plaquettes et au VWF alors que la botrocétine se lie directement au VWF induisant une modification conformationnelle qui permet l'interaction de ce complexe à la GPIb.

Dans la 1^{ère} partie de ce mémoire, j'ai présenté l'étude de VWF plasmatique de divers sous-types de VWD ayant une anomalie de liaison aux plaquettes, l'identification des anomalies moléculaires responsables de ces phénotypes (anomalies localisées dans la boucle du domaine A1 du VWF) et l'expression des protéines recombinantes correspondantes obtenues par mutagenèse dirigée sur l'ADNc complet du VWF et transfection transitoire en cellules Cos-7.

Ces travaux qui illustrent l'hétérogénéité de l'expression phénotypique de la VWD et les multiples aspects fonctionnels du VWF ont permis d'approfondir la connaissance des rapports entre la structure et le mécanisme de la liaison du VWF à la GPIb.

- L'importance du domaine A1 du VWF est reconnue et confirmée par l'identification de mutations sur ce domaine initialement associé à la **VWD de type 2B** puisque c'est ce phénotype qui est été mis en évidence en 1^{er} dans ce domaine. Ce phénotype est caractérisé par une **hyperaffinité du VWF pour la GPIb plaquettaire** induisant l'absence de multimères de HPM dans le plasma. Certains recombinants de type 2B VWD ont même la capacité d'interagir spontanément avec la GPIb [Ribba et coll 1992 ; Inbal et coll 1993 ; Hilbert et coll 1998] alors que d'autres nécessitent une très faible concentration de modulateur [Kroner et coll 1992, Randi et coll 1992]. Il est à noter que le VWF dépourvu d'acide sialique, comme le VWF porcin ou bovin est capable de se lier directement à la GPIb humaine sans l'aide d'un inducteur extérieur [Gralnick et coll 1985].

Les mutations de type 2B ne sont pas localisées dans le site de liaison à la GPIb ce qui est en accord avec le concept que ce sont les changements de conformation induits par ces mutations qui reproduisent des mécanismes régulant cette interaction sans impliquer directement ces résidus dans le contact [Varughese et coll 2002]. Beaucoup de ces mutations sont situées près des régions N- et C-terminales du domaine A1 ce qui suggère que ces résidus pourraient avoir éventuellement des interactions avec les domaines D3 et A2 adjacents. Mais l'implication de ces 2 domaines dans la régulation de la fonction du domaine A1 reste à établir [Varughese et coll 2002].

Type 2B	Type 2M	Type 2A	Type Indéterminé
<i>P1266L (503)</i>	<i>V1279I (516)</i>	<i>C1272R (509)</i> <i>mais génotype 2B</i>	<i>R1315C (552)</i>
<i>H1268D (505)</i>	<i>L1282R (519)</i>	<i>C1272G (509)</i> <i>mais génotype 2B</i>	<i>Duplication de</i> <i>S1352-A1386 (589 -623)</i>
H1268N (505)	<i>S1285F (522)</i>	<i>L1276P (513)</i>	<i>F1369I (606)</i>
<i>M1304insM</i> <i>(ins Met 540)</i>	<i>L1296P (533)</i>	<i>R1308H (545)</i> <i>mais génotype 2B</i>	<i>R1374C (611)</i>
<i>R1306Q (543)</i>	<i>D1302G (539)</i>	<i>V1314F (551)</i> <i>mais génotype 2B</i>	<i>R1374H (611)</i>
R1306L (543)	<i>R1315C (552)</i>	R1315C (552)	<i>R1374L (611)</i>
<i>R1306W (543)</i>	<i>G1324S (561)</i>	R1315G (552)	<i>R1374S (611)</i>
<i>R1308C (545)</i>	<i>G1324A (561)</i>	<i>L1383P (620)</i>	<i>R1379C (616)</i>
<i>R1308P (545)</i>	<i>S1325C (562)</i>	<i>C1458Y (695)</i>	<i>L1383R (620)</i>
<i>I1309V (546)</i>	<i>E1359K (596)</i>		<i>R1399C (636)</i>
<i>S1310F (547)</i>	<i>K1362T (599)</i>		<i>K1405delK (642)</i>
S1310P (547)	<i>F1369I (606)</i>		<i>N1421K (658)</i>
<i>W1313C (550)</i>	Q1402R (639)		P1462A (699)
<i>V1314L (551)</i>	<i>I1425F (662)</i>		
<i>V1314D (551)</i>	<i>A1437T (674)</i>		
<i>V1316M (553)</i> <i>parfois phénotype 2A</i>	<i>P1467S (704)</i>		
P1337L (574)	Q1191del11*		

Table 1 : Classification des mutations identifiées dans le domaine A1 du VWF.

En italique : mutations incluses dans la banque de données <http://www.sheffield.ac.uk/vwf>

En gras : mutations du réseau INSERM, encore non incluses

En italique et en gras : mutations du réseau INSERM, incluses

Ombree : mutations classées dans différents types.

* Mutation identifiée par Mancuso et coll 1996

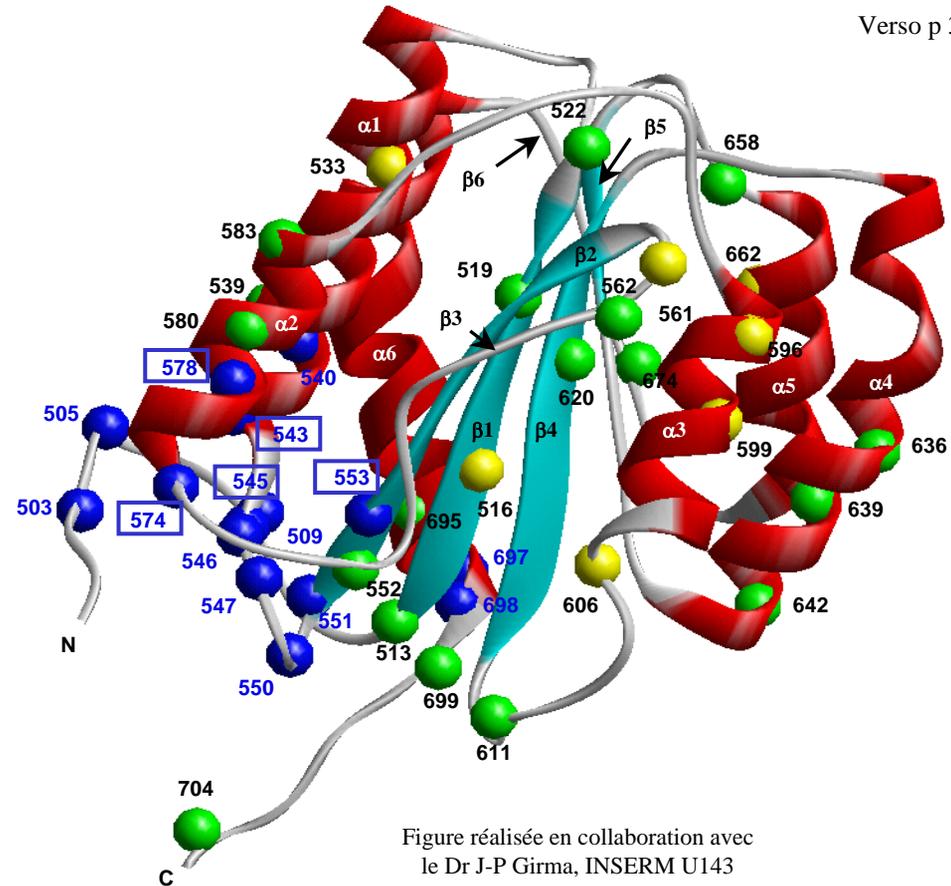


Figure réalisée en collaboration avec le Dr J-P Girma, INSERM U143

Figure 9 : Localisation des mutations identifiées dans le domaine A1 du VWF.

En bleu : aa impliqués dans le type 2B (liaison VWF/GPIb augmentée aux faibles doses de ristocétine).

En vert : aa impliqués dans les types 2A, 2M ou indéterminé (liaison VWF/GPIb diminuée avec la ristocétine et la botrocétine).

En jaune : aa impliqués dans le type 2M, sous-type « B » (liaison VWF/GPIb diminuée avec la ristocétine mais normale avec la botrocétine).

La majorité des mutations de type 2B (**Table 1**) sont situées dans une même région à l'intérieur de la boucle du domaine A1, entre les aa R1303 (540) et R1341 (578) mais comme rapporté dans la **publication 1**, certaines mutations peuvent être situées en dehors de cette boucle. Néanmoins, la position de ces mutations dans la structure tridimensionnelle du domaine A1 montre qu'elles sont toutes regroupées dans la partie inférieure de ce domaine (**Figure 9**). Les mutations de type 2B les plus fréquentes en position R1306 (543), R1308 (545), V1316 (553), P1337 (574) et R1341 (578) semblent concentrées dans la même zone. Il est intéressant de noter que les changements d'aa à des positions associées avec le type 2B ont été identifiées sur le VWF porcine, aa 1306 (543), 1308 (545), 1313 (550) et 1314 (551) [Bahnak et coll 1992] et bovine, 1308 (545), 1313 (550) et 1314 (551) [Bakhashi et coll 1992] qui se lient de façon spontanée à la GPIIb humaine.

- Des mutations dans cette même boucle du domaine A1 peuvent être associées à un phénotype différent de celui de la VWD de type 2B (**Table 1**). Comme rapporté dans les **publications 2 et 3**, certaines mutations induisent une **perte d'affinité du VWF pour la GPIIb plaquettaire** associée ou non à une diminution des multimères de HPM. Alors que les mutations induisant une augmentation d'affinité du VWF pour la GPIIb plaquettaire sont localisées dans la partie inférieure du domaine A1, la majorité des mutations qui aboutissent à une perte sélective d'affinité pour ce récepteur sont groupées dans la partie supérieure extérieure de ce domaine (**Figure 9**). La plupart des mutations qui inhibent la liaison induite par la ristocétine sont du même côté par rapport aux feuillettes β centraux, comme les sites pour la GPIIb et la botrocétine. De plus, la structure tridimensionnelle du domaine A1 permet de voir que les mutations de type « B » sont distribuées autour de la Lysine 1362 (599) ; elles pourraient inhiber l'exposition du site GPIIb induite par la ristocétine mais à l'opposé, elles ne perturberaient pas la liaison à la botrocétine qui resterait donc capable d'induire une liaison aux plaquettes [Matsushita et coll 2000]. L'identification de ces mutations de type « B » confirme bien la différence de mécanismes d'action de la ristocétine et de la botrocétine.

En conclusion, l'identification et la distribution de mutations induisant des phénotypes différents confirme l'importance du domaine A1 du VWF dans sa fonction avec les plaquettes, la conformation de ce domaine étant primordiale dans la régulation de cette interaction. En conditions normales, le domaine de liaison du VWF à la GPIIb est masqué probablement par les interactions électrostatiques existant entre les séquences négatives flanquant la boucle du domaine A1 et les séquences positives situées à l'intérieur de cette boucle. L'interaction du VWF avec des modulateurs permettrait de démasquer le domaine fonctionnel capable de se lier à la GPIIb. Le même type de mécanisme peut être suggéré lorsque le VWF est immobilisé sur un ligand présent dans le sous-endothélium.

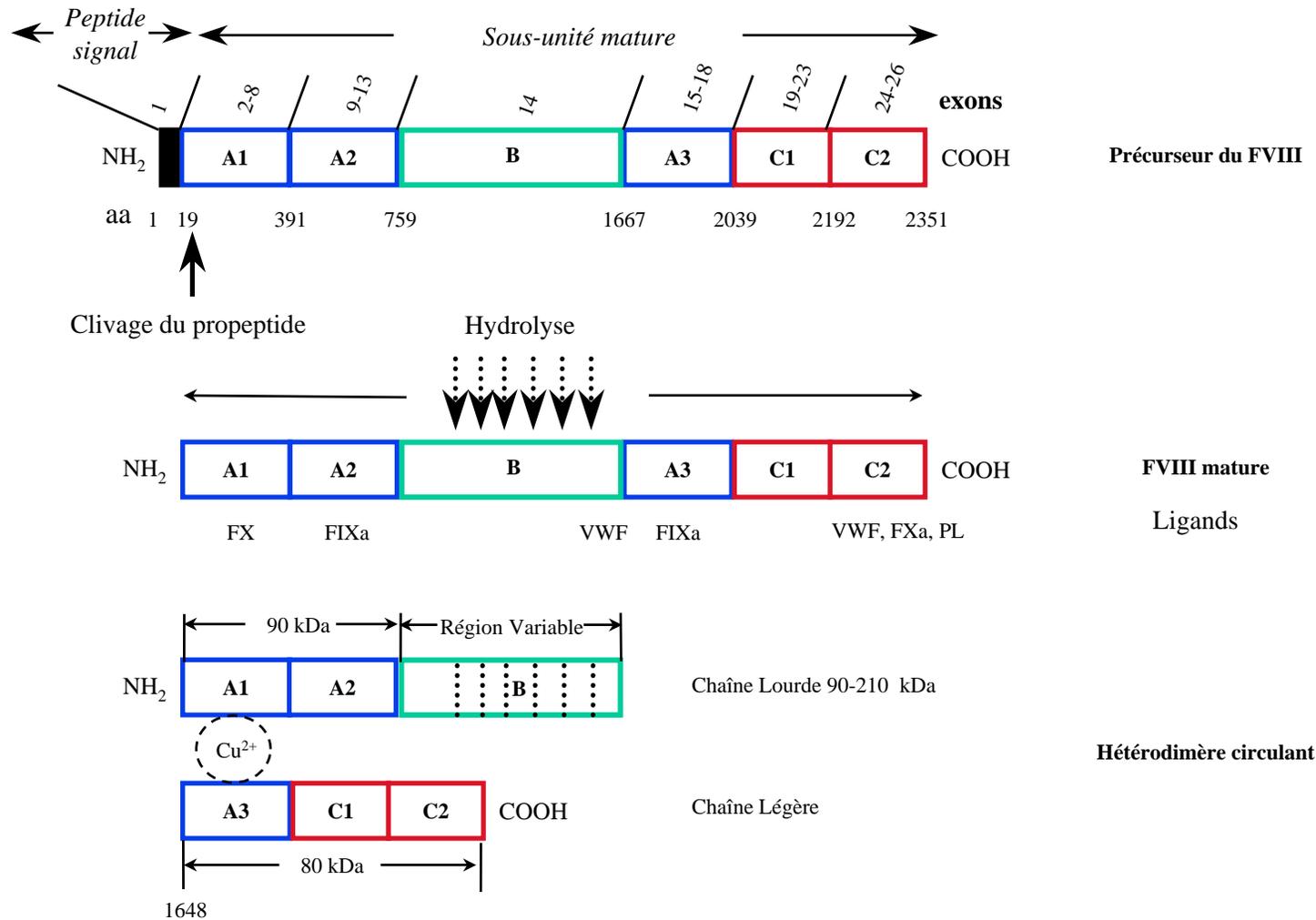


Figure 10 : Représentation schématique de la structure du FVIII.

Localisation des domaines d'homologie structurale (A-C) et des sites de liaison du FVIII avec le VWF, les autres facteurs de la coagulation et les phospholipides (PL).

SECONDE PARTIE

Etude d'anomalies moléculaires responsables de défauts de liaison du VWF au FVIII

INTRODUCTION

I – LE FACTEUR VIII

A – Biosynthèse et structure

Le FVIII est une protéine plasmatique qui a été longtemps confondue avec le VWF avec lequel il est associé dans le plasma sous forme d'un complexe. C'est pour cette raison que ces 2 facteurs sont généralement copurifiés car le complexe FVIII/VWF n'est dissociable que dans des conditions non physiologiques de force ionique élevée (CaCl_2 0.35M). Le clonage des ADNc de ces deux facteurs a permis de montrer qu'il s'agit bien de deux glycoprotéines distinctes. Le gène du FVIII, cloné en 1984 [Gitschier et coll] s'étend sur 186 kb, sur le bras long du chromosome X. Vingt six exons, de 69 à 3106 pb, codent pour un ARNm de 9 kb traduit en une chaîne polypeptidique de 2351 aa comprenant un peptide signal de 19 aa qui est clivé, au niveau du réticulum endoplasmique, lors du processus de maturation de la protéine (**Figure 10**).

Le précurseur du FVIII est une molécule monocaténaire de 2332 aa et de masse moléculaire d'environ 265 kDa non glycosylée (330 kDa après glycosylation). Cette protéine est constituée de trois types de domaines d'homologie, A, B, C, selon l'enchaînement A1-A2-B-A3-C1-C2 (**Figure 10**). Cette protéine monocaténaire fait l'objet d'une hydrolyse spontanée au niveau des domaines B et A3 ainsi que d'une glycosylation essentiellement sur le fragment B. A l'issue de ces mécanismes de maturation, le FVIII est scindé en une chaîne légère de 80 kDa (LC), correspondant aux domaines A3-C1 et C2 et en une chaîne lourde (HC) de taille variable (90 à 210 kDa) mais formée au minimum des domaines A1 et A2 et éventuellement d'un fragment du domaine B contigu à A2. La HC est associée, par un ion cuivre, à la LC et c'est cet hétérodimère qui est la forme plasmatique circulante.

Les 3 domaines A jouent un rôle essentiel dans la stabilisation de la molécule. Les 2 domaines C présentent des homologies avec les lectines et permettent la liaison aux glycoconjugués et aux phospholipides ; ils sont donc essentiels aux fonctions du FVIII. Dix neuf des 23 cystéines du FVIII sont localisées dans les domaines A et C [McMullen et coll 1995].

Le domaine B, qui est clivé lors du processus d'activation, est riche en chaînes glycaniques qui ont un effet protecteur vis à vis de l'action protéolytique exercée par la thrombine. En effet, le domaine B contient 19 des 25 N-glycanes du FVIII [Vehar et coll 1984]. Le domaine B n'est pas essentiel aux fonctions du FVIII car le FVIII recombinant, délété au niveau de ce domaine conserve ses propriétés coagulantes.

Le taux plasmatique normal de cette protéine est de 0,1 à 0,2 µg/ml (celui du VWF étant de 7 à 10 µg/ml) mais il existe, comme pour le VWF, des variations individuelles importantes. Le taux de FVIII serait plus élevé chez les sujets de groupe sanguin A. Cette valeur physiologique peut augmenter dans diverses circonstances : traitements oestroprogestatifs, grossesse, stress, effort physique.

B – Fonctions et rôles

L'activité fonctionnelle du FVIII est acquise après des processus de maturation et d'activation de la molécule précurseur. Le FVIII sous sa forme hétérodimérique stabilisée par un ion métallique est inactif. Une activation protéolytique est nécessaire pour former le FVIIIa cofacteur actif du FIXa au sein de la cascade de la coagulation (**Figure 2**). Dans ce système, le FVIIIa accélère sa vitesse de protéolyse de manière considérable (X10 000) expliquant la gravité des manifestations hémorragiques associées au déficit constitutionnel en FVIII (hémophilie A).

Des systèmes composés de facteurs de coagulation purifiés ont permis de montrer que l'activation du FVIII par la thrombine est associée au clivage de la LC, entre sa partie N-terminale acide et le domaine A3 et aboutit à la forme activée du FVIII constituée de l'hétérotrimère A1/A2/A3-C1-C2.

II – HEMOPHILIE A

A – Classification

L'hémophilie A, tout comme la VWD, est une affection hémorragique constitutionnelle et héréditaire mais elle est liée à un déficit en FVIII. La sévérité clinique de cette affection dépend de l'importance du déficit et elle est classifiée en hémophilie mineure (taux résiduel de l'activité coagulante du FVIII >5 IU/dl), modérée (1–5 IU/dl) et sévère (<1 IU/dl). Son mode de transmission est récessif, lié au chromosome X, transmis par les femmes, dites « conductrices » et exprimé chez l'homme. Elle touche une naissance masculine sur 5 000.

B – Manifestations cliniques et diagnostic biologique

Dans l'**hémophilie sévère**, le début des accidents hémorragiques est habituellement précoce, souvent à la suite d'une chute occasionnée par les premiers pas de l'enfant. La localisation des hémorragies est variable ; elles peuvent être extériorisées (gingivorragies, épistaxis, ...) ou intratissulaires (hématomes sous-cutanés ou intra-musculaires pouvant, par compression, s'accompagner d'une paralysie ou entraîner une hémarthrose). Par ordre de fréquence, ce sont les genoux qui sont le plus souvent atteints, puis les chevilles et les coudes. Dans ces formes sévères, le diagnostic d'hémophilie est souvent évoqué par l'histoire clinique et les antécédents familiaux. Ce diagnostic est confirmé par la mise en évidence d'une anomalie importante de la coagulation (temps de coagulation, temps de céphaline-kaolin, consommation de prothrombine). Mais, c'est le dosage spécifique de l'activité du FVIII qui permet de préciser la sévérité de l'atteinte du patient.

A côté de cette forme classique sévère, les **formes modérées**, très fréquentes sont révélées soit par des accidents hémorragiques variés, traumatiques, soit à l'occasion d'une avulsion dentaire ou d'une amygdalectomie. Dans ces formes, le diagnostic est plus difficile. En l'absence de signes hémorragiques graves, d'antécédents familiaux, seul le dosage du FVIII permet le diagnostic de ces formes modérées.

Les techniques chronométriques de dosage du FVIII sont basées sur 2 principes différents :

- Soit **méthode en 1 temps** : basée sur l'étude de la correction d'un plasma d'hémophile A sévère par addition du plasma à tester. Cette méthode est simple mais a comme inconvénient d'être peu précise et de nécessiter de grandes quantités de plasma d'hémophile A.
- Soit **méthode en 2 temps**, dérivée du test de génération de la thromboplastine et basée sur l'étude de la formation de prothrombinase dans un mélange contenant en excès tous les facteurs nécessaires à l'exception du FVIII que l'on dose dans le plasma témoin ou du patient, à différentes dilutions. La prothrombinase formée est ensuite testée sur un plasma normal (source de thrombine et de fibrinogène). Cette méthode est plus sensible que la précédente et ne nécessite pas de plasma d'hémophile.

C – Génétique de l'hémophilie A

L'inversion d'un segment du chromosome X comportant les exons 1 à 22 du gène du FVIII et résultant de la recombinaison intrachromosomique entre 2 séquences homologues, l'une située dans l'intron 22 du gène (intron qui s'étend sur plus de 30 kb), l'autre de 200 à 500 kb en amont du gène, côté télomérique, est responsable d'environ la moitié des cas d'hémophilie A sévère.

Les délétions, de petite taille (de 1 à quelques paires de bp) ou de grande taille (de 2 à 210 kb), couvrant différentes régions du gène ne permettent d'expliquer qu'une faible proportion des formes sévères. Quelques insertions de même que des mutations non-sens (codons stop) responsables de formes sévères, des mutations faux-sens le plus souvent à l'origine de formes modérées ou mineures, et des mutations responsables d'une anomalie d'épissage de l'ARN, associées à des formes de sévérité variable selon la position de la mutation par rapport à la jonction exon/intron ont été également décrites (HAMSTeRS, The Haemophilia A Mutation, Structure, Test, Resource Site : <http://europium.csc.mrc.ac.uk/>).

III – LE COMPLEXE FVIII/VWF

Les deux molécules, FVIII et VWF, sont synthétisées par des cellules différentes et s'associent dans le foie, après leur sécrétion, probablement au niveau de l'espace de Disse entre les hépatocytes et les cellules endothéliales sinusoidales, pour former le complexe plasmatique VWF/FVIII [Vlot et coll 1996]. Bien que les concentrations molaires de ces deux facteurs dans le plasma soient difficiles à calculer du fait de l'hétérogénéité de leur masse moléculaire (170 à 290 kDa pour le FVIII et de 500 à > 10 000 kDa pour le VWF), il est vraisemblable que le VWF se trouve en large excès par rapport au FVIII dans le sang.

Le FVIII présente une très grande affinité pour le VWF ; ainsi, plus de 95% du FVIII est associé au VWF dans le plasma. De plus, lorsqu'on injecte du FVIII dépourvu de VWF à un patient hémophile, 95 % du FVIII s'associe au VWF endogène en 12 secondes [Vlot et coll 1996]. Cette association protège le FVIII contre la dégradation par la protéine C activée ou le FXa [Meyer et Girma, 1993]. La durée de vie du FVIII plasmatique est ainsi prolongée grâce à sa fixation au VWF. La 1/2 vie du FVIII est d'environ 1–2 heures alors qu'en présence de VWF, elle atteint 10–12 heures. Le VWF plasmatique en se liant au FVIII lui sert non seulement de protéine porteuse mais stabilise donc aussi son activité coagulante.

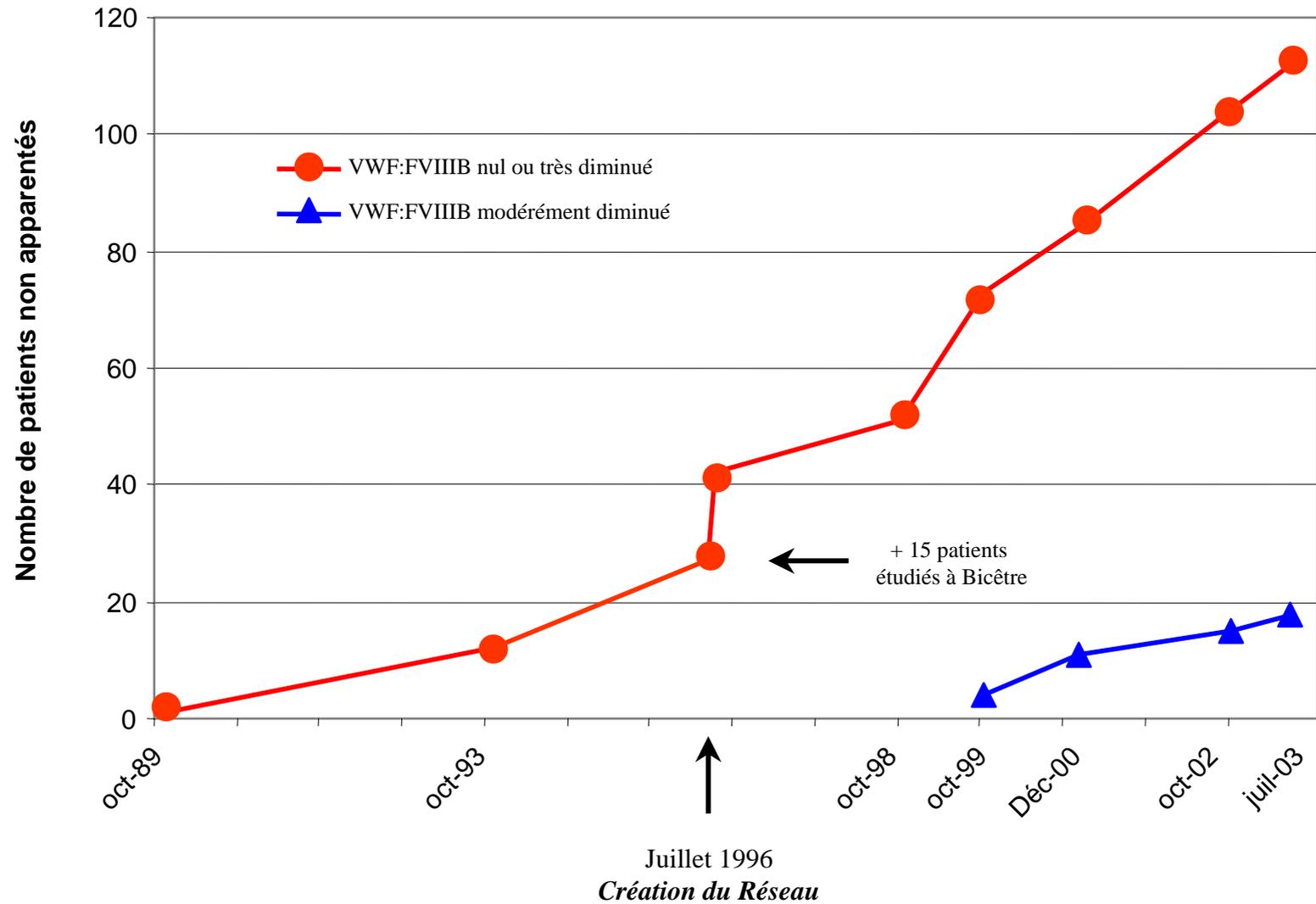


Figure 11 : Progression du diagnostic de la VWD de type 2N dans le cadre du Réseau INSERM, fondé sur le résultat de la liaison du VWF au FVIII

Ces deux molécules s'associent par des liaisons non covalentes entre certains domaines spécifiques. Des sites de fixation du VWF sont localisés sur la LC du FVIII et, plus particulièrement, sur sa partie N-terminale (aa 1649-1689) riche en aa acides et dans son domaine C2 (aa 2173 à 2332) [Lenting et coll 1998 ; Vlot et coll 1998]. D'autre part, on sait depuis 1987 que le fragment protéolytique correspondant aux 272 premiers aa du VWF mature (incluant le domaine D' et une partie du domaine D3 du VWF) est capable de fixer le FVIII [Takahashi et coll ; Foster et coll]. La présence d'un second site de fixation sur le reste de la molécule du VWF a été longtemps évoquée, mais cette hypothèse a été abandonnée [Layet et coll 1992] et il a été montré que la délétion des domaines A1, A2 et A3 n'affecte pas la capacité du VWF à fixer le FVIII [Koppelman et coll 1996].

IV – LA MALADIE DE WILLEBRAND DE TYPE 2N

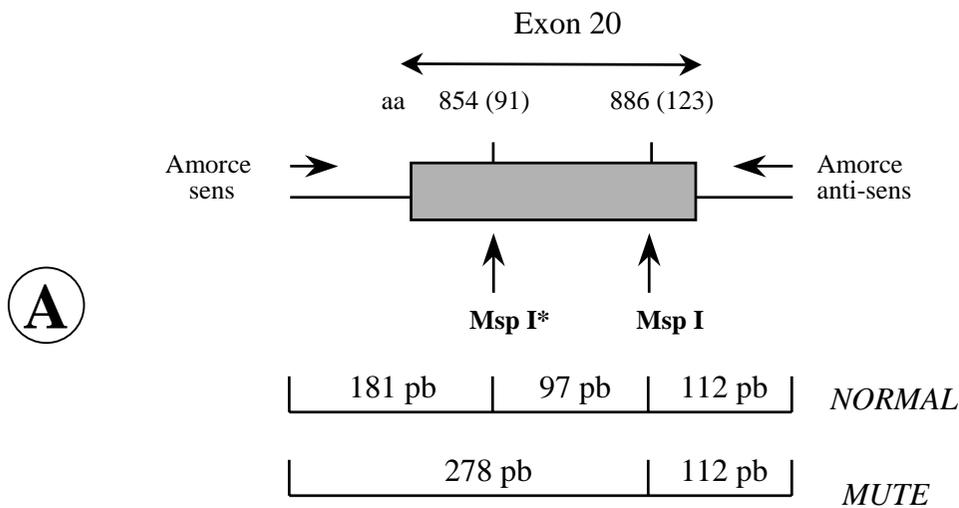
A – Introduction

C'est en France qu'a été caractérisé pour la première fois, en 1989 [Nishino et coll], un sous-type particulier de VWD, de transmission récessive, appelé initialement «Normandie», du nom de la province d'origine de la patiente chez qui la 1^{ère} anomalie moléculaire a été identifiée [Mazurier et coll 1990]. Ces patients appelés depuis « variants 2N » n'ont généralement aucune anomalie du TS, présentent des taux normaux de VWF (que ce soit par dosage antigénique ou par mesure de l'activité VWF:RCo), une répartition multimérique du VWF normale, mais présentent un déficit, souvent modéré, en FVIII. C'est pourquoi ces patients ont été longtemps considérés comme hémophiles A (mineurs ou modérés) ou comme conductrices d'hémophilie A [Mazurier 1992]. Ainsi, lorsque le taux de FVIII est compris entre 2 et 35% de la normale, les 2 diagnostics peuvent être envisagés (hémophilie A ou/et VWD de type 2N). L'étude de la liaison du VWF plasmatique du patient à du FVIII exogène (qui n'est réalisée que dans quelques laboratoires) permet de mettre en évidence l'anomalie d'affinité du VWF pour le FVIII et donc de distinguer un déficit constitutionnel en FVIII d'une anomalie qualitative du VWF.

Ce test, réalisé en microplaque a permis le diagnostic de la VWD de type 2N (ie VWF:FVIIIIB très diminué) chez de nombreux patients étudiés dans le cadre du réseau INSERM. Ainsi, plus d'une centaine de familles françaises ont été diagnostiquées, à ce jour, comme étant atteintes du sous-type 2N VWD (**figure 11**). En outre, depuis 4 ans, des patients inclus dans ce Réseau (car suspectés d'être atteints de VWD de type 2N) ont révélé une anomalie de liaison de leur VWF plasmatique au FVIII modérément diminuée (**Figure 11**) n'expliquant pas leur taux de FVIII anormal. Il est probable que ces patients soient porteurs de 2 anomalies moléculaires, une du VWF et une du FVIII comme c'est le cas de la patiente A présentée dans la publication 5 du chapitre II.

B – Génétique de la maladie de Willebrand de type 2N

Le domaine de liaison du VWF au FVIII ayant été localisé au niveau des 272 premiers aa de la sous-unité mature du VWF, c'est dans cette région que les anomalies moléculaires à l'origine de la VWD de type 2N sont recherchées en premier lieu. Certains patients de type 2N VWD sont homozygotes ou double hétérozygotes pour une anomalie moléculaire de ce type; d'autres sont hétérozygotes composites type 2N/type 3 et peuvent avoir un déficit quantitatif conjoint en VWF. Bien que la 1^{ère} anomalie moléculaire identifiée chez un patient de type 2N VWD soit la mutation T791M [Gaucher et coll 1991a], c'est la mutation R854Q qui est la plus fréquemment identifiée chez ces patients [Mazurier et Meyer 1996].



A

B

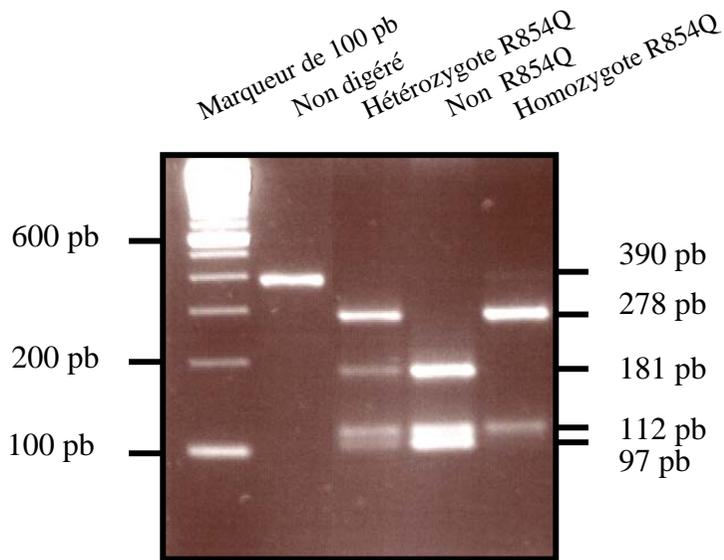


Figure 12 : Identification de la mutation R854Q chez un individu atteint de VWD de type 2N

A – Localisation des sites enzymatiques Msp I dans l'exon 20 du gène du VWF. L'astérisque indique le site Msp I détruit par la mutation R854Q (91).

B – Profil de digestion enzymatique Msp I d'un individu normal et des patients hétérozygote ou homozygote pour la mutation R854Q (91).

C'est pourquoi, la recherche des anomalies moléculaires responsables du phénotype 2N des patients débute-t-elle par la recherche de la mutation R854Q, recherche qui se fait par digestion enzymatique (**Figure 12**). En effet, la mutation R854Q induit la destruction d'un site enzymatique MspI situé à cette position. Le profil de digestion d'un fragment de PCR amplifié (dans nos conditions expérimentales) à partir de l'exon 20 du gène du VWF d'un individu normal montre trois bandes de 181 bp, 112 bp et 97 pb, respectivement alors que celui d'un patient homozygote (ou hémizyote) pour cette mutation montre seulement deux bandes de 278 bp et 112 bp. Le profil d'un patient hétérozygote pour cette anomalie montre la présence de 4 bandes de 278 bp, 181 bp, 112 bp et 97 bp.

Lorsque le profil de digestion indique que le patient est homozygote ou hémizyote pour la mutation R854Q, ce résultat est alors confirmé par séquençage direct de l'exon 20 du gène du VWF. A l'opposé, quand le patient n'est pas porteur de cette anomalie ou porteur de cette anomalie seulement à l'état hétérozygote, les exons 18 à 20 du gène du VWF (codant pour le domaine D') sont séquencés. En effet, sur la vingtaine d'anomalies moléculaires identifiées chez des patients de type 2N VWD (banque de données), la majorité d'entre elles ont été localisées dans le domaine D' du VWF. Ensuite, le séquençage des exons 21 à 27 (codant pour le domaine D3) est entrepris.

CHAPITRE I

Identification et expression d'anomalies moléculaires de type 2N VWD localisées dans le domaine D' du VWF

RAPPEL

Le VWF plasmatique est associé au FVIII sous la forme d'un complexe non covalent et cette interaction prolonge la survie du FVIII dans la circulation. Ainsi, tout changement du taux de VWF plasmatique induit-il un changement similaire du taux de FVIII plasmatique [de Wit et van Mourik 2001]. C'est pourquoi, dans la VWD, le taux bas de VWF est associé à un taux faible de FVIII. A l'opposé, un taux faible de FVIII n'altère pas le taux de VWF plasmatique.

Dans la VWD de type 2N, le taux bas de FVIII est lié à un défaut fonctionnel du VWF qui est incapable de se lier au FVIII. Comme le domaine principal de liaison du VWF au FVIII est situé dans la partie N-terminale du VWF comprenant les aa 764 à 1035 (1 à 272), la recherche d'une anomalie moléculaire induisant un défaut de liaison du VWF au FVIII se fait, après la recherche de la mutation R854Q, par séquençage des exons 18 à 20 du gène du VWF codant pour le domaine D' du VWF

PUBLICATION N° 4 : *Hilbert L, Jorieux S, Lavergne JM, Fontenay-Roupie M, Ruan C, Boinot C, Fressinaud E, Meyer D, Mazurier C. Importance of exon 18 of von Willebrand factor gene in its capacity to bind factor VIII. Pour soumission à Journal of Thrombosis and Haemostasis.*

A – Caractérisation du phénotype des patients

Cette étude a été réalisée chez 3 patients non apparentés. Les patients A et C, d'origine française, ont été étudiés au LFB de Lille alors que le patient B, d'origine chinoise, a été étudié à l'INSERM U143 du Kremlin-Bicêtre. Les 3 patients présentent des caractéristiques communes incluant un TS normal, des taux de VWF normaux mais des taux de FVIII diminués (< 20 IU/dl).

La capacité du VWF plasmatique à se lier au FVIII des patients A et C est très diminuée, confirmant le diagnostic de VWD de type 2N de ces patients alors que celle du patient B est pratiquement normale. Malheureusement, le résultat pour le patient B n'a pu être confirmé ou infirmé par l'étude d'un second prélèvement.

Le profil multimérique du VWF plasmatique du patient A est anormal avec en particulier la présence de multimères supranormaux et un « smear » dans la zone des multimères de HPM. A l'opposé, les patients B et C présentent des profils multimériques normaux de leur VWF plasmatique.

B – Caractérisation du génotype des patients

Alors que les patients A et C avaient été inclus dans le Réseau INSERM en raison d'une suspicion de diagnostic de VWD de type 2N, basée sur leurs données phénotypiques et confirmée par la liaison anormale de leur VWF à se lier au FVIII, le patient B avait été étudié en tant que témoin normal dans une recherche de mutations du VWF par électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DDGE). C'est l'observation d'un profil anormal de migration avec cette technique qui

avait permis de montrer que ce patient était porteur d'une anomalie moléculaire sur le gène du VWF. Par la suite, un interrogatoire plus poussé avait confirmé que le patient souffrait d'hémarthroses et de saignements cutanés, données qu'il avait omis de signaler lors de son prélèvement sanguin.

La recherche de la mutation R854Q, mutation de type 2N VWD la plus fréquente a montré que cette anomalie était présente, à l'état hétérozygote, chez les patients A et C.

De plus, l'étude des fragments d'ADN, après amplification par PCR de l'exon 18 du gène du VWF a permis l'identification, à l'état hétérozygote, de transitions A→G en position 2384 et 2398 induisant respectivement la substitution Y795C (Tyr32Cys) chez la patiente A et **M800V** (Met37Val) chez le **patient chinois B**. Une transversion G→T en position 2411 induisant la substitution C804F (Cys41Phe) a été identifiée, à l'état hétérozygote toujours dans cet exon 18, chez le patient C. Les **patients A et C** sont donc **doubles hétérozygotes** pour 2 anomalies moléculaires **R854Q** (91) et **Y795C** (32) ou **R854Q** (91) et **C804F** (41), respectivement. Le patient B n'est hétérozygote que pour une anomalie moléculaire M800V (37), aucune autre anomalie exceptée les polymorphismes déjà rapportés n'ayant été identifiée dans les exons 18 à 27 du gène du VWF de ce patient.

C – Etude de VWF recombinants mutés

L'expression transitoire, par des cellules Cos-7, du VWF_r porteur de la mutation candidate M800V (37) est normale et similaire à celle du recombinant non muté ou du recombinant porteur de la mutation R854Q (91). A l'opposé, le taux d'expression des recombinants Y795C (32) et C804F (41) est, respectivement, modérément ou très diminué.

La capacité des recombinants porteurs des mutations Y795C (32) et C804F (41) à fixer le FVIII est nulle alors que celle du recombinant porteur de la mutation M800V (37) est nettement diminuée (~ 25% de la capacité du VWF_r normal). La capacité du recombinant porteur de la mutation R854Q (91) est très diminuée mais non nulle.

La structure multimérique des recombinants porteurs des mutations R854Q (91) et M800V (37) est normale alors que celle des recombinants porteurs des mutations C804F (41) et Y795C (32) est anormale. En effet, le recombinant C804F (41) est caractérisé par la diminution des multimères de HPM et IPM corrélée à une augmentation du pourcentage du protomère. A l'opposé, le recombinant porteur de la mutation Y795C (32) montre la présence de multimères ultralarges représentés par un « smear » qui démarre dès le puits de migration de l'échantillon.

Les 2 recombinants porteurs des mutations C804F (41) et Y795C (32) ne sont pas reconnus par l'Acm 418 dont l'épitope est situé entre les aa 765 (2) et 816 (53) indiquant un changement de conformation de ces molécules dans cette région. A l'opposé, les recombinants porteurs des mutations R854Q (91) et M800V (37) sont bien reconnus par les divers Acm testés.

D – Conclusion

Cet article décrit l'identification et l'expression de 3 nouvelles mutations induisant un défaut de liaison du VWF_r au FVIII. Ces 3 mutations, Y795C (32), M800V (37) et C804F (41) sont localisées dans l'exon 18 du gène du VWF où de nombreuses autres mutations de type 2N VWD ont déjà été rapportées (banque de données), confirmant l'importance de cet exon dans la liaison du VWF au FVIII. C'est pourquoi, la 1^{ère} conclusion de cette étude est que cet exon 18 doit être préférentiellement séquencé lors de l'étude génotypique d'un patient de type 2N VWD, après recherche de la mutation R854Q (91) qui reste toujours prioritaire.

Deux de ces mutations nouvellement identifiées, Y795C (32) et C804F (41), induisent une modification du nombre de cystéines présentes sur la molécule de VWF, portant ce nombre à un nombre impair. Le domaine D' du VWF contient 16 cystéines impliquées dans des ponts intramoléculaires (et dont la moitié ont leur pont disulfure déjà positionné) assurant une stabilité structurale de cette région. Or, la mutation C804F (41) induit la disparition de la cystéine 804 impliquée dans un pont disulfure intra-chaîne avec la cystéine 776 (13). Il n'est donc pas surprenant que cette disparition perturbe la conformation tridimensionnelle de cette partie de la molécule induisant un défaut de multimérisation du VWF, comme le montre bien la structure multimérique anormale du recombinant correspondant. A l'opposé, la mutation Y795C (32) induit l'apparition d'une cystéine surnuméraire. Dans ce cas, le recombinant n'est pas caractérisé par la diminution de multimères de HPM mais par la présence de multimères « supranormaux », comme si la présence de cette cystéine surnuméraire induisait une multimérisation du VWF encore plus importante qu'en conditions normales. Néanmoins, la traînée du profil multimérique du recombinant porteur la mutation Y795C (32), visible aussi sur le VWF plasmatique du patient, indique que cette multimérisation n'est pas « naturelle » et que la conformation tridimensionnelle de la molécule est perturbée.

Le changement de conformation induit par les 2 mutations C804F (41) et Y795C (32) est confirmé par l'absence de reconnaissance de ces 2 recombinants par l'Acm 418 dont l'épitope est situé dans cette région.

La mutation M800V (37) n'induit qu'un défaut modéré de liaison du VWF_r porteur de cette anomalie au FVIII sans altérer la synthèse et la sécrétion de cette molécule, et ce défaut est moins prononcé que dans le cas des autres mutations de type 2N déjà rapportées. Bien que le phénotype du patient n'ait pas pu être confirmé, cette anomalie peut aussi être considérée comme anomalie induisant une VWD de type 2N.

**IMPORTANCE OF EXON 18 OF VON WILLEBRAND FACTOR GENE
IN VWF CAPACITY TO BIND FACTOR VIII**

Authors : L. HILBERT^{*}, S. JORIEUX^{*}, J-M LAVERGNE[†], M. FONTENAY-ROUPIE[‡], C. RUAN^{**}, M. GUICHETEAU^{††}, E. FRESSINAUD[†], D. MEYER[†], C. MAZURIER^{*} and the INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease.

Institute : ^{*} LFB, Lille ; [†] INSERM U143, Le Kremlin Bicêtre; [‡] Département d'Hématologie, Hôpital Cochin, Paris; ^{**} Jiangsu Institute of Hematology, Suzhou, China; ^{††} Laboratoire d'Hémostase, CHU, Poitiers.

Running title : Importance of exon 18 of VWF gene in VWF:FVIIIIB

Key words : mutation, expression studies, von Willebrand factor, von Willebrand disease

Correspondence : Dr L. Hilbert, Ph D, Unité de Développement Préclinique, Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies, 59 rue de Trévis, BP 2006, 59011 Lille Cédex, France
Phone number : (33) 3.20.49.44.44 ; Fax number : (33) 3.20.49.44.71 ; e-mail : hilbert@lfb.fr

CHAPITRE II

Identification et expression d'anomalies moléculaires de type 2N VWD localisées dans le domaine D3 du VWF

RAPPEL

La majorité des mutations rapportées dans la banque de données sont localisées dans le domaine D' du VWF et sont fréquemment situées dans l'exon 18 du gène du VWF (lorsqu'il ne s'agit pas de la mutation R854Q (91), localisée, elle, dans l'exon 20 du gène du VWF). Cinq de ces mutations induisent la disparition ou l'apparition d'une cystéine et affectent la structure secondaire du domaine de fixation au FVIII. Comme rapporté dans cette publication, quelques mutations impliquant ou non des résidus cystéines et localisées cette fois dans le domaine D3 du VWF affectent aussi la liaison du VWF au FVIII. Ces mutations induiraient un changement de conformation de ce domaine D3 qui rejaillirait sur l'accessibilité ou/et la conformation du site de liaison avec le FVIII situé dans le domaine D'. Ainsi, ces mutations du domaine D3 induiraient de façon indirecte un phénotype 2N VWD.

PUBLICATION N° 5 : Hilbert L, Jorieux S, Proulle V, Favier R, Goudemand J, Parquet A, Meyer D, Fressinaud E, Mazurier C. Two novel mutations, Q1053H and C1060R, located in the D3 domain of von Willebrand factor, are responsible for decreased FVIII-binding capacity. *Br J Haematol* 2003, 120: 627-632.

A – Caractérisation du phénotype des patients

Dans cette publication, nous rapportons le cas de 7 patients appartenant à des familles non apparentées, présentant des taux abaissés en FVIII mais normaux ou subnormaux en VWF. Cinq de ces patients (B à F) présentent une absence totale de liaison du VWF plasmatique au FVIII alors que les 2 autres patients (A et G) présentent une liaison modérément diminuée similaire à celle de patients hétérozygotes pour une VWD de type 2N. Le VWF plasmatique du patient A est bien multimérisé avec même la présence de multimères supranormaux alors que le profil multimérique du VWF des autres patients montre une diminution plus ou moins importante des multimères de HPM, en particulier de ceux > 10 mères.

B – Caractérisation du génotype des patients

La recherche de la mutation R854Q (91) a montré que cette mutation est présente à l'état hétérozygote, chez les patients B et C. Le séquençage des exons 18 à 20 du gène du VWF des patients (codant pour le domaine D' du VWF) n'a révélé aucune anomalie moléculaire (hormis les polymorphismes déjà répertoriés). Nous avons alors entrepris le séquençage des exons 21 à 24 du gène du VWF (codant pour le domaine D3 du VWF).

L'étude des fragments d'ADN, après amplification par PCR de l'exon 21 du gène du VWF du patient G a permis l'identification, à l'état hétérozygote, d'une transition G→A en position 2771 ayant pour conséquence la substitution R924Q (Arg161Gln). De plus, le séquençage de l'exon 24 du gène du VWF de ce patient a permis l'identification d'une transition T→C en position 3178 induisant la substitution C1060R (Cys297Arg) anomalie détectée à l'état homozygote (ou hémizygotique) chez les patients D, E et F et à l'état hétérozygote chez les patients B, C et G. Les **patients B et C** sont donc **doublets hétérozygotes** pour les 2 anomalies moléculaires **R854Q (91) et**

C1060R (297). Le **patient G**, dont la liaison du VWF plasmatique au FVIII est modérément diminuée est porteur de 2 anomalies moléculaires **C1060R** (297) et **R924Q** (161) suggérant que l'une d'entre elles est probablement un polymorphisme. Alors que le patient **D** est **homozygote** pour l'anomalie **C1060R** (297), les **patients E et F** sont hémizygotés pour cette anomalie comme l'a montré l'identification d'un codon stop dans l'exon 9 (Y357X) chez le patient E et d'une délétion au minimum des exons 18 à 40 du gène du VWF chez le patient F. Ces patients sont donc **hétérozygotes composite** pour une anomalie moléculaire de type **2N** et de type **3 VWD**, en accord avec leur taux de VWF:Ag diminué.

Une seconde anomalie moléculaire dans l'exon 24, G→T en position 3159 induisant la substitution Q1053H (Gln290His) a été identifiée à l'état hétérozygote, chez la patiente A. Comme le taux diminué de FVIII et les symptômes hémorragiques de cette patiente ne pouvaient être expliqués par une mutation de type 2N VWD à l'état hétérozygote, le gène du FVIII de cette patiente a été séquencé (collaboration avec l'INSERM U143, Le Kremlin-Bicêtre) et une transition C/T dans le promoteur du gène du FVIII a été identifiée chez cette patiente de même que chez son père. Par conséquent, la **patiente A** est non seulement **hétérozygote** pour une anomalie de type **2N VWD Q1053H** (290) mais **aussi conductrice d'hémophilie A**.

C – Etude de VWF recombinants mutés

L'expression transitoire, par des cellules Cos-7, des VWF_r porteurs des mutations R924Q (161), Q1053H (290) et C1060R (297) est normale et similaire à celle de recombinant non muté. La capacité du recombinant porteur de la mutation Q1053H (290) à se fixer au FVIII est très diminuée et similaire à celle du recombinant porteur de la mutation R854Q (91). Alors que le recombinant porteur de la mutation R924Q (161) se lie de façon normale au FVIII, le recombinant porteur de la mutation C1060R (297) est incapable de se lier au facteur anti-hémophilique A.

La structure multimérique des recombinants porteurs des mutations R854Q (91), R924Q (161) et Q1053H (290) est normale. A l'opposé, celle du recombinant porteur de la mutation C1060R (297) est anormale avec une diminution des multimères de HPM corrélée à une augmentation du pourcentage du protomère. Ce recombinant est par ailleurs mieux reconnu par l'Acm anti-VWF 14A12 dont l'épitope est localisé entre les aa 904 (141) et 983 (220) du VWF.

D – Conclusion

Cette publication décrit l'identification et l'expression de 2 nouvelles mutations de type 2N VWD, Q1053H (290) et C1060R (297) localisées dans le domaine D3 du VWF et qui induisent une diminution de la capacité du VWF à se lier au FVIII. A l'opposé, la substitution R924Q (161) est un polymorphisme comme l'a confirmé l'expression transitoire de cette anomalie. Il est à noter qu'un changement d'aa similaire, R852Q (89), s'est aussi avéré être en réalité un polymorphisme [Cacheris et coll 1991] bien que situé à proximité immédiate de la mutation de type 2N la plus fréquente, R854Q (91), qui implique, elle aussi, le même changement d'aa.

Ces résultats montrent donc que des substitutions d'aa situées en dehors du fragment N-terminal du VWF mature peuvent perturber l'interaction du VWF avec le FVIII, vraisemblablement en modifiant l'accessibilité ou/et la conformation du domaine D' de fixation du FVIII. La mutation C1060R (297) a été identifiée à l'état homozygote, hémizygoté ou hétérozygote confirmant bien l'hétérogénéité de cette maladie. De plus, l'identification de la mutation C1060R (297) confirme que certaines mutations affectent non seulement la capacité du VWF à fixer le FVIII mais aussi son degré de sécrétion et de multimérisation comme rapporté pour les mutations D879N (116) et C1225G (462) localisées également dans le domaine D3 du VWF [Jorieux et coll 1998 ; Allen et coll 2000] et les mutations C788Y (25), C788R (25) et C858F (95) localisées dans le domaine D' [Jorieux et coll 2000 ; Allen et coll 2000].

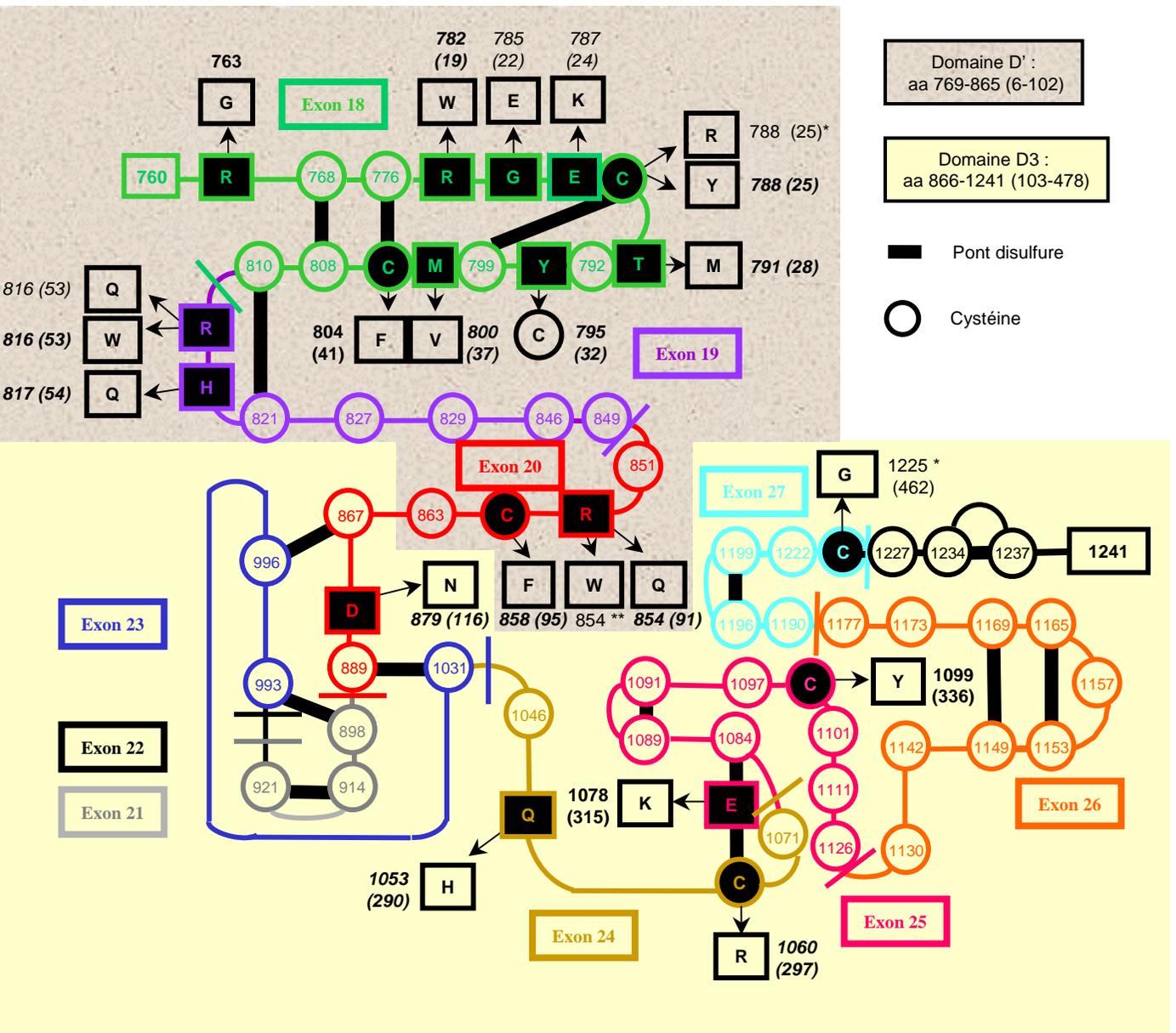


Figure 13 : Localisation des mutations de type 2N VWD.

Les mutations représentées *en italique* sont celles incluses dans la banque de données <http://www.sheffield.ac.uk/vwf>

Les mutations représentées **en gras** sont celles identifiées dans le cadre du réseau INSERM et non encore incluses dans la banque de données.

Les mutations représentées ***en italique et en gras*** sont celles identifiées dans le cadre du réseau INSERM et incluses dans la banque de données.

* Mutation identifiée par Allen et coll 2000

** Mutation identifiée par Bowen et coll 1998

CONCLUSION SUR LES MUTATIONS DE TYPE 2 INDUISANT UN DEFAUT DE LIAISON DU VWF AU FVIII

La VWD de type 2N, découverte il y a une quinzaine d'années se traduit par un taux diminué de FVIII circulant, comparable à celui trouvé dans les formes mineures ou modérées d'hémophilie A qui sont, elles, connues depuis plus d'un demi-siècle. Ces deux maladies induisent un déficit significatif du FVIII. Leur diagnostic différentiel est important pour le conseil génétique et la thérapeutique. Dans l'hémophilie A, le déficit est corrigé par la desmopressine ou des concentrés de FVIII. Chez les variants 2N, la dDAVP n'élève pas toujours suffisamment le taux de FVIII et sa durée de vie est trop brève puisqu'il ne peut être protégé par le VWF fonctionnellement anormal. Pour la même raison, les concentrés de FVIII sont inefficaces avec une durée de vie trop courte du FVIII transfusé et seuls les concentrés de VWF sont appropriés.

L'identification des mutations faux-sens du gène du VWF chez les patients classés dans le type 2N de la VWD a permis de préciser que certains résidus d'aa du VWF jouent un rôle crucial dans l'interaction VWF:FVIII. La majorité des mutations rapportées dans la banque de données internationale (12/15) ont été identifiées entre les aa 782 (19) et 858 (95) du domaine D' du VWF (**Figure 13**). Cinq d'entre elles induisent la disparition ou l'apparition d'une cystéine et affectent donc la structure secondaire du domaine de fixation du FVIII. Certains aa en position 788 (25), 816 (53) et 854 (91) semblent être des sites préférentiels pour les mutations puisque 2 mutations différentes ont été rapportées sur ces aa.

D'autres mutations sont localisées dans le domaine D3 du VWF dont la majorité en dehors des 272 aa du fragment N-terminal de la sous-unité mature. Ces mutations peuvent affecter l'interaction VWF:FVIII vraisemblablement en induisant un changement de conformation de la molécule qui perturbe l'accessibilité au domaine de fixation du FVIII.

Très peu d'information sur la structure tridimensionnelle des domaines D', comprenant les aa 769 à 865 (6-102) et D3 comprenant les aa 866 à 1241 (103-478) sont disponibles. Néanmoins, il a été noté que les domaines D' et D3 peuvent comporter 46 % de coudes β et présentent vraisemblablement une structure très compacte [Mazurier 1989]. Leurs repliements sont stabilisés par des cystéines dont certaines ont leur pont disulfure « intrachaine » déjà positionné, comme illustré dans la **figure 13** [Marti et coll 1987].

Il est à signaler que la majorité (16/22) des anomalies moléculaires de type 2N VWD décrites ont été identifiées par notre laboratoire principalement dans le cadre du Réseau INSERM (**Figure 13**). De plus, toutes les nouvelles anomalies moléculaires que nous avons identifiées ont été exprimées pour confirmation de leur effet sur la liaison du VWF au FVIII.

Depuis l'identification par les 2 équipes françaises impliquées dans le Réseau INSERM du variant Normandie, le diagnostic de VWD de type 2N a été porté chez plus d'une centaine de familles présentant un phénotype similaire (**Figure 11**). Chaque année, le diagnostic de VWD de type 2N est porté dans une vingtaine de nouvelles familles françaises. Toutes les études familiales montrent que l'anomalie est transmise sur le mode autosomal récessif. Il est à noter que les hétérozygotes, asymptomatiques, ont un phénotype et en particulier un taux de FVIII normal à l'exception de la liaison du VWF au FVIII qui est intermédiaire entre celle d'un sujet normal et celle d'un sujet homozygote [Mazurier et coll 1990].

Tables 2 : Résultats de la recherche des anomalies moléculaires du VWF chez les patients inclus dans le cadre du Réseau INSERM

A : Chez 109 familles ayant un VWF:FVIIIIB nul ou très diminué

Mutation sur le 1 ^{er} allèle	Mutation sur le 2 ^{ème} allèle	Nombre de Familles affectées	Pourcentage
R854Q (91)	R854Q (91)	52	48% 11% 29% 88%
	R763G	1	
	C788Y (25)	1	
	T791M (28)	2	
	Y795C (32)	1	
	C804F (41)	1	
	R816W (53)	1	
	C858F (95)	1	
	C1060R* (297)	2	
	E1078K* (315)	1	
	C1099Y* (336)	1	
	Type 3 identifiée	6	
	Type 3 probable	26	
	T791M (28)	1	
Type 3 identifiée	2		
Type 3 probable	2		
R816W (53)	R816W (53)	3	3,5%
	Type 3 probable	1	
D879N * (116)	Type 3 identifiée	1	1%
C1060R * (297)	C1060R* (297)	1	3%
	Type 3 identifiée	2	

B : Chez 16 familles ayant un VWF:FVIIIIB modérément diminué

Mutation sur le 1 ^{er} allèle	Mutation sur le 2 ^{ème} allèle	Nombre de Familles affectées	Pourcentage
R854Q (91)	-	10	62,5%
H817Q (54)	R782W (19)	1	37,5%
	H817Q (54)	2	
	-	1	
H1053Q* (290)	-	1	
C1060R* (297)	-	1	

* Mutation identifiée dans le domaine D3 (les autres mutations sont dans le domaine D')

Le bilan du Réseau INSERM portant sur l'étude moléculaire de la VWD de type 2N indique que 88 % des familles françaises ayant une liaison du VWF au FVIII nulle ou très diminuée sont porteuses de l'anomalie moléculaire R854Q (91) sur au moins 1 des 2 allèles (**Table 2A**). Deux autres mutations, T791M (28) et R816W (53), identifiées dès les 1^{ères} études sur la VWD de type 2N [Gaucher et coll 1991 a et b] ont été identifiées chez 4 % des familles françaises étudiées. Il est à noter que la mutation R816W (53) a été identifiée souvent dans des familles d'origine portugaise suggérant un effet fondateur de cette anomalie.

Les patients 2N VWD présentent un syndrome hémorragique d'une sévérité variable et ont, selon les individus, une activité coagulante du FVIII modérément ou très nettement abaissée et des taux de VWF normaux ou diminués. Cette diversité pourrait être expliquée par le fait qu'environ la moitié d'entre eux sont des hétérozygotes composites. L'association de 2 mutations de type 2N VWD telle que nous l'avons rapportée dans ce mémoire, dans la publication 4 pour les mutations Y795C (32) et C804F (41) associée à la mutation R854Q (91) et dans la publication 5 pour la mutation C1060R (297) également associée à la mutation R854Q (91), n'est pas très fréquente. Le plus souvent, la 2^{ème} anomalie moléculaire est une anomalie quantitative du VWF (en accord avec un taux de VWF plasmatique diminué). Celle-ci est souvent non identifiée (~ 1 cas sur 3) (**Table 2A**).

Ces 4 dernières années, nous avons été amenés à étudier, en biologie moléculaire, des patients présentant des taux de FVIII diminués avec des taux de VWF normaux, patients qui se sont avérés avoir une liaison de leur VWF plasmatique à fixer le FVIII modérément diminuée. Ces patients sont généralement porteurs d'une seule mutation de type 2N VWD, fréquemment la mutation R854Q (91) (**Table 2B**). Ces patients sont probablement, comme le patient A de la publication 5, affectés par une 2^{ème} anomalie cette fois sur le gène du FVIII expliquant leurs taux de FVIII diminués. Notons également que l'anomalie H817Q (54) à l'état homozygote ou associée à la mutation R782W (19) à l'état hétérozygote a été identifiée chez des patients présentant des défauts de liaison modérés au FVIII (**Table 2B**). Ces 2 anomalies ont déjà été rapportées, sur le même allèle, chez un patient américain et semblent se comporter de façon « intermédiaire » entre une mutation de type 2N VWD et un polymorphisme, seule l'association de 2 de ces anomalies induisant un phénotype similaire à celui d'un patient hétérozygote pour une anomalie de type 2N VWD [Kroner et coll 1996].

Nos derniers travaux, encore non publiés, ont permis d'identifier pour la 1^{ère} fois une anomalie moléculaire dans le site de clivage du propeptide, mutation R763G, qui induit chez le patient et ses enfants porteurs de cette anomalie un défaut de liaison au FVIII. Ces résultats confirment des travaux précédents qui montraient que le VWF doit être clivé et avoir son résidu sérine 764 (1) libre en position N-terminale pour pouvoir fixer le FVIII [Bendetowicz et coll 1998].

Enfin, il est à noter que quelques mutations de type 2N VWD affectent non seulement la capacité du VWF à fixer le FVIII mais aussi son taux de sécrétion et/ou son degré de multimérisation. La plupart de ces mutations induisent l'apparition ou la disparition d'une cystéine, déstabilisant ainsi la structure tridimensionnelle de la protéine mais la mutation D879N (116), bien que n'impliquant pas de résidus cystéine est également responsable d'un défaut de multimérisation du VWF plasmatique et recombinant [Jorieux et coll 1998].

CONCLUSION

Depuis de nombreuses années, le laboratoire de recherche dirigé par le Dr Claudine MAZURIER a orienté ses travaux vers l'étude du VWF et de la VWD associée. L'objectif de ce laboratoire était double : d'une part identifier les anomalies génétiques responsables de cette affection héréditaire chez les divers types de patients VWD et d'autre part, exprimer les anomalies moléculaires nouvellement identifiées pour confirmer non seulement la relation entre le génotype et le phénotype du patient mais aussi compléter les connaissances des relations structure-fonctions du VWF.

Comme mentionné dans l'introduction de ce mémoire, un réseau INSERM de recherche clinique sur les anomalies moléculaires de la VWD de type 2 a été créé en France, en juillet 1996 et s'est terminé en Juillet 2003. A sa création, ce réseau concernait 27 centres et à sa clôture, 42 centres étaient impliqués, ce qui témoigne bien de la nécessité et de l'intérêt d'un tel réseau. Plus de 1200 demandes d'inclusion ont été déposées que ce soit pour la recherche de défaut de liaison du VWF à la GPIb plaquettaire (études réalisées à l'INSERM U143 du Kremlin-Bicêtre) ou de défaut de liaison au FVIII (études réalisées au CHR de Lille ou par nos soins). Plus de 1000 demandes ont été acceptées, dont la moitié concernait une demande pour suspicion de VWD de type 2N. La recherche de l'anomalie moléculaire a été réalisée chez 310 familles françaises de type 2 et les résultats indiquent que le type 2N VWD est le type le plus fréquent dans cette population (36 %), suivi par le type 2B (25 %). Le diagnostic de type 2M a été porté dans 17 % des cas et celui de type 2A dans 14 %.

Ce réseau a eu une importance majeure pour le patient (et le clinicien chargé de sa thérapeutique) car le diagnostic réel a ainsi pu être porté. Dans le cadre de notre participation, à Lille, le test de liaison du VWF au FVIII a permis d'exclure le diagnostic de VWD de type 2N dans 3 cas sur 4 étudiés, suggérant que les patients étaient soit hémophiles A ou conductrices d'hémophilie A. Il est à signaler que la confirmation du diagnostic de type 2N VWD ne permet pas d'exclure pour autant une anomalie du gène du FVIII, les patients pouvant être porteurs de défauts simultanément sur ces 2 gènes (exemple de la patiente A étudiée dans la **publication 5**). Le diagnostic de type 2N VWD a été porté dans 112 familles dont 109 ont été étudiées en biologie moléculaire pour l'identification de la mutation responsable de leur phénotype.

Au cours de ces années, nous avons constaté que la mutation R854Q (91) est la mutation la plus fréquente et que, si quelques uns des 100 premiers aa du VWF mature sont fortement impliqués dans la formation du complexe VWF/FVIII, en particulier ceux codés par l'exon 18 du gène du VWF (**publication 4**), d'autres aa situés en dehors de cette zone préférentielle du domaine D' jouent également un rôle crucial dans cette interaction (**publication 5**).

L'autre domaine fonctionnel du VWF auquel nous nous sommes intéressés dans ce mémoire est celui impliqué dans l'interaction avec la GPIb plaquettaire. Son importance est capitale puisqu'il est l'un des supports de l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium. Nous avons présenté l'expression de plusieurs VWF_r portant des substitutions d'aa situés à l'intérieur de la boucle du domaine A1 du VWF. Ces VWF_r reproduisent des mutations ponctuelles identifiées chez des patients atteints de différentes formes de VWD, caractérisés par une réactivité augmentée ou diminuée du VWF pour la GPIb.

Ainsi, les VWFr de **type 2B**, qui sont tous complètement multimérisés, ont la particularité de se lier aux plaquettes en présence de très faibles concentrations de modulateur qui ne permettent pas la liaison du VWFr normal. Certains de ces recombinants peuvent même se lier aux plaquettes en absence de modulateur (**publication 1**). Ces variants sont facilement caractérisés sur la base de leur hyperaffinité pour les plaquettes et l'expression des mutations confirme toujours le diagnostic biologique. C'est pourquoi, ce type est maintenant un des mieux caractérisés et n'est guère sujet à controverse.

Nous avons également présenté le cas de certaines mutations situées dans la boucle du domaine A1 du VWF mais qui n'induisent pas de réactivité augmentée du VWF pour la GPIb. C'est le cas de la mutation G1324A (561) identifiée dans une famille atteinte de VWD de type **2M**, sous-type « B » ; le VWFr portant cette mutation présente une interaction normale avec la GPIb en présence de botrocétine mais diminuée en présence de ristocétine, reproduisant le phénotype caractéristique observé chez le patient (**publication 3**). Ce type qui ne représentait que quelques cas isolés, il y a quelques années, est identifié actuellement chez de plus en plus fréquemment. Ainsi dans le cadre du réseau INSERM, l'unité U143 du Kremlin Bicêtre a identifié plus d'une dizaine de mutations induisant chez le patient un défaut de liaison du VWF à la GPIb non associé à une diminution des multimères de HPM. Ces mutations ont été identifiées soit dans le domaine A1 du VWF, comme les 1^{ères} mutations de type 2M VWD rapportées mais aussi récemment dans le domaine D3 du VWF, sans pour autant que les patients soient affectés par une anomalie de liaison de leur VWF plasmatique au FVIII. L'expression de ces mutations doit être réalisée pour confirmer leur classification en type 2M VWD. En effet, l'hétérogénéité des symptômes et données phénotypiques conduit parfois à classer des patients dans différents sous-types alors que l'identification ultérieure de la mutation indique qu'ils sont porteurs de la même anomalie. C'est le cas de l'anomalie moléculaire R1374C (611) classée par notre équipe en 1995, en type 2 indéterminé (**publication 2**) qui a été classée en type 1 dans 4 familles suédoises [Lethagen et coll 1998] et en type 2M dans une famille italienne [Casonato et coll 2001]. Cet exemple témoigne de la difficulté à clairement différencier certains types 1, 2M et 2A. Un critère majeur de classification de ces patients est basé sur l'analyse de la structure multimérique du VWF plasmatique, étude qui n'est pas réalisée systématiquement dans tous les laboratoires. C'est ainsi que l'étude européenne sur la maladie de VWD de type 1 montre que 40 % des patients inclus dans cette étude seraient en réalité atteints d'anomalies structurales de leur VWF [Budde U, Allemagne responsable de l'analyse multimérique de ce projet, communication personnelle] et par conséquent appartiendraient au type 2A VWD plutôt qu'au type 1 VWD. La distinction entre type 2M et type 2A n'est pas non plus toujours aisée. En effet, les patients étant, en général, hétérozygotes pour ces anomalies moléculaires, la disparition des multimères de HPM n'est pas toujours clairement visible sur le VWF plasmatique ; mais l'expression à l'état homozygote de la protéine recombinante permet d'observer l'effet de la mutation sur la structure de la protéine et favorise ainsi la classification de la mutation. C'est pourquoi, le SSC de l'ISTH a proposé de rediscuter de la classification de la VWD suite à ces différents problèmes. Il est à rappeler, que dans quelques rares cas, bien que le patient présente un phénotype 2A VWD, il peut être porteur d'une anomalie de type 2B VWD induisant une quasi disparition des multimères de HPM pour ne laisser dans le plasma que les plus petits multimères, se liant faiblement aux récepteurs plaquettaires.

La caractérisation des différents variants de VWD quelque soit leur classification illustre bien l'hétérogénéité de l'expression phénotypique de la VWD liée à des mutations sur le même domaine de la sous-unité et démontre aussi la nécessité de l'expression de ces mutations pour aider à la confirmation du diagnostic.

Ma conclusion sur les travaux de ce mémoire est que le réseau INSERM a eu une importance majeure

- pour le patient dont le diagnostic précis a pu être porté et par la même la thérapeutique mieux adaptée
- pour les études épidémiologiques françaises
- pour la recherche scientifique française. Ce réseau est reconnu internationalement pour ses recherches dans cette affection héréditaire et pour sa participation active à l'étude des relations structure/fonction de cette protéine complexe et multifonctionnelle qu'est le VWF.

RÉFÉRENCES

Allen S, Abuzenadah AM, Blagg JL, Hinks J, Nesbitt IM, Goodeve AC, Gursel T, Ingerslev J, Peake IR, Daly ME. (2000) Two novel type 2N von Willebrand disease-causing mutations that result in defective factor VIII binding, multimerization, and secretion of von Willebrand factor. *Blood* 95: 2000

Andrews RK, Booth WJ, Gorman JJ, Castaldi PA, Berndt MC. (1989) Purification of botrocetin from *Bothrops jararaca* venom. Analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Biochem* 28: 8317

Azuma H, Hayashi T, Dent JA, Ruggeri ZM, Ware J. (1993a) Disulfide bond requirements for assembly of the platelet glycoprotein-Ib-binding domain of von Willebrand factor. *J Biol Chem* 268: 2821

Azuma H, Sugimoto M, Ruggeri ZM, Ware J. (1993b) A role for von Willebrand factor proline residues 702-704 in ristocetin-mediated binding to platelet glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* 69: 192

Bahnak BR, Lavergne JM, Ferreira V, Kerbiriou Nabias D, Meyer D. (1992) Comparison of the primary structure of the functional domains of human and porcine von Willebrand factor that mediate platelet adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 561

Bakhashi MR, Myers JC, Howard PS, Soprano DR, Kirby EP. (1992) Sequencing of the primary adhesion domain of bovine von Willebrand factor. *Biochem Biophys Acta* 1132: 325

Bendetowicz AV, Morris JA, Wise RJ, Gilbert GE, Kaufman RJ. (1998) Binding of factor VIII to von Willebrand factor is enabled by cleavage of the von Willebrand factor propeptide and enhanced by formation of disulfide-linked multimers. *Blood* 92: 529

Berndt MC, Waerd CM, Booth WJ, Castaldi PA, Mazurov AV, Andrews RK. (1992) Identification of Aspartic acid 514 through glutamic acid 542 as a glycoprotein Ib-IX complex receptor recognition sequence in von Willebrand factor. Mechanism of modulation of von Willebrand sequence in von Willebrand factor. Mechanism of modulation of von Willebrand factor by ristocetin and botrocetin. *Biochemistry* 31: 11144

Blombäck M, Encroth P, Andersson O, Anwret M. (1992) On laboratory problems in diagnosing mild von Willebrand's disease. *Am J Hematol* 40: 117

Bolhuis PA, Sakariassen KS, Sander HJ, Bouma BN, Sixma JJ. (1981) Binding of factor VIII-von Willebrand factor to human arterial subendothelium precedes increased platelet adhesion and enhances platelet spreading. *J Lab Clin Med* 97: 568

Bowen DJ, Standen GR, Mazurier C, Gaucher C, Cumming A, Keeney S, Bidwell J. (1998) Type 2N von Willebrand disease: Rapid genetic diagnosis of G2811A (R854Q), C2696T (R816W), T2701A (H817Q) and G2823T (C858F) – Detection of a novel candidate type 2N mutation : C2810T (R854W). *Thromb Haemost* 80: 32

Cacheris PM, Nichols WC, Ginsburg D. (1991) Molecular characterization of a unique von Willebrand disease variant: a novel mutation affecting von Willebrand factor/factor VIII interaction. *J Biol Chem* 266: 13499

Casonato A, Pontar E, Sartorello F, Bertomoro A, Durante C, Girolami A. (2001) Type 2M von Willebrand disease variant characterized by abnormal von Willebrand factor multimerization. *J Lab Clin Med* 137: 70

Celikel R, Varughese KI, Madhusudan, Yoshioka A, Ware J Ruggeri ZM. (1998) Crystal structure of the von Willebrand factor A1 domain in complex with the function blocking NMC-4 Fab. *Nat Struct Biol* 5: 189

Chopek MW, Girma JP, Fujikawa K, Davie EW, Titani K. (1986) Human von Willebrand factor: A multivalent protein composed of identical subunits. *Biochemistry USA* 25: 3146

Coller BS, Gralnick HR. (1977) Studies on the mechanism of ristocetin-induced platelet agglutination. Effects of structural modification of ristocetin and vancomycin. *J Clin Invest* 60: 302

Colombatti A, Bonaldo P. (1991) The superfamily of proteins with von Willebrand factor type-A-like domains - One theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood* 77: 2305

Conlan MG, Folsom AR, Finch A, Davis CE, Sorlie P, Marcucci G, Wu KK. (1993) Association of factor-VIII and von Willebrand's factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis: the atherosclerosis risk in communities (ABIC) study. *Thromb Haemost* 70: 380

Dent JA, Berkowitz SD, Ware J, Kasper CK, Ruggeri ZM. (1990) Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6306

de Wit TR, van Mourik JA. (2001) Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: Biological implications. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 241

Emsley J, Cruz M, Handin R, Liddington R. (1998) Crystal structure of the von Willebrand factor A1 domain and implications for the binding of platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 273: 10396

Enayat MS, Guillatt AM, Surdhar GK, Jenkins PV, Pasi KJ, Toh CH, Williams MD, Hill FG. (2001) Aberrant dimerization of von Willebrand factor as the result of mutations in the carboxy-terminal region: identification of 3 mutations in members of 3 different families with type 2A (phenotype IID) von Willebrand disease. *Blood* 98: 674

Foster PA, Fulcher CA, Marti T, Titani K, Zimmerman TS. (1987) A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. *J Biol Chem* 262: 8443

Fujikawa K, Suzuki H, Mc Mullen B, Chung D. (2001) Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metallo-proteinase family. *Blood* 98: 1662

Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, Russell S, Roberts JR, Elder JH, Ruggeri ZM, Zimmerman TS, Girma JP, Meyer D. (1986) Von Willebrand factor: A reduced and alkylated 52/48 kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 261: 381

Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, Roberts JR, Kostel P, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. (1987) A heparin-binding domain of human von Willebrand factor. Characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val⁴⁴⁹ to Lys⁷²⁸. *J Biol Chem* 262: 1734

Fujimura Y, Titani K, Usami Y, Suzuki M, Oyama R, Matsui T, Fukui H, Sugimoto M, Ruggeri ZM. (1991) Isolation and chemical characterization of two structurally and functionally distinct forms of botrocetin, the platelet coagglutinin isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochem* 30: 1957

Furlan M, Robles R, Lämmle B. (1996) Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by *in vivo* proteolysis. *Blood* 87: 4223

Gaucher C, Jorieux S, Mercier B, Oufkir D, Mazurier C. (1991a) The Normandy variant of von Willebrand disease. Characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene. *Blood* 77: 1937

Gaucher C, Mercier B, Jorieux S, Oufkir D, Mazurier C. (1991b) Identification of two point mutations in the von Willebrand factor gene of three families with the "Normandy" variant of von Willebrand disease. *Br J Haematol* 78: 506

Gaucher C, Diéval J, Mazurier C. (1994) Characterization of von Willebrand factor gene defects in two unrelated patients with type IIC von Willebrand disease. *Blood* 84: 1024

Gaucher C, de Romeuf C, Rautis-Morret M, Corazza F, Fondu P, Mazurier C. (1995) Diagnosis of subtype 2B von Willebrand disease in a patient with 2A phenotype of plasma von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 73: 610

Gaucher C, Uno H, Yamazaki T, Mashiba H, Mazurier C. (1998) A new candidate mutation (N528S) within the von Willebrand factor propeptide identified in a Japanese patient with phenotype IIC of von Willebrand disease. *Eur J Haematol* 61: 145

Gerritsen HE, Robles R, Lämmle B, Furlan M. (2001) Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood* 98: 1654

Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJJ, Montgomery RR. (1987) The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 69: 1691

Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GAP, Latt SA, Orkin SH. (1985) Human von Willebrand factor (vWF): Isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosome localization. *Science* 228: 1401

Girma JP, Takahashi Y, Yoshioka A, Diaz J, Meyer D. (1990) Ristocetin and botrocetin involve two distinct domains of von Willebrand factor for binding to platelet membrane glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* 64: 326

Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RW. (1984) Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312: 326

Gralnick HR, Williams SB, Collier BS. (1985) Asialo von Willebrand factor interactions with platelets. *J Clin Invest* 75: 19

Hamako J, Matsui T, Suzuki M, Ito M, Makita K, Fujimura Y, Oseki Y, Titani K. (1996) Purification and characterization of bitiscetin, a novel von Willebrand factor modulator protein from *Bitis arietans* snake venom. *Biochem Biophys Res Comm* 226: 273

Hilbert L, Gaucher C, de Romeuf C, Horellou MH, Vink T, Mazurier C. (1994) Leu 697→Val mutation in mature von Willebrand factor is responsible for type IIB von Willebrand disease. *Blood* 83: 1542

Hilbert L, Gaucher C, Abgrall JF, Parquet A, Trzeciak C, Mazurier C. (1998) Identification of new type 2B von Willebrand disease mutations : Arg543Gln, Arg545Pro and Arg578Leu. *Br J Haematol* 103: 877

Hilbert L, Jenkins PV, Gaucher C, Mériane E, Collins PW, Pasi KJ, Mazurier C. (2000) Type 2M VWD resulting from a lysine deletion within a four lysine residues repeat in the A1 loop of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 84: 188

Hillery CA, Mancuso DJ, Sadler JE, Ponder JW, Jozwiak MA, Christopherson PA, Gill JC, Scott JP, Montgomery RR. (1998) Type 2M von Willebrand disease: F606I and I662F mutations in the glycoprotein Ib binding domain selectively impair ristocetin- but not botrocetin-mediated binding of von Willebrand factor to platelets. *Blood* 92: 1572

Inbal A, Kornbrot N, Harrison P, Randi AM, Sadler JE. (1993) Effect of type IIB von Willebrand disease mutation Arg(545)Cys on platelet glycoprotein Ib binding. Studies with recombinant von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 70: 1058

Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. (1974) Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 1906

Jenkins CSP, Clemetson KJ, Lüscher EF. (1979) Studies on the mechanism of ristocetin-induced agglutination : binding of ristocetin to platelets. *J Lab Clin Med* 93: 220

Jenkins PV, Pasi KJ, Perkins SJ. (1998) Molecular modeling of ligand and mutations sites of the type A domains of human von Willebrand factor and their relevance to von Willebrand's disease. *Blood* 92: 2032

Jorieux S, Gaucher C, Goudemand J, Mazurier C. (1998) A novel mutation in the D3 domain of von Willebrand factor markedly decreases its ability to bind factor VIII and affects its multimerization. *Blood* 92: 4663

Jorieux S, Fressinaud E, Goudemand J, Gaucher C, Meyer D, Mazurier C, and the Inserm Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand disease. (2000) Conformational changes in the D' domain of von Willebrand factor induced by Cys25 and Cys95 mutations lead to FVIII binding defect and multimeric impairment. *Blood* 95: 3139

Kadir RA, Economides DL, Sabin CA, Owens D, Lee CA. (1998) Frequency of inherited bleeding disorders in women with menorrhagia. *Lancet* 351: 485

Koedam JA, Meijers JCM, Sixma JJ, Bouma BN. (1988) Inactivation of human Factor VIII by activated protein C: Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J Clin Invest* 82: 1236

Koedam JA, Harmer RJ, Beesevlsseer NH, Bouma BN, Sixma JJ. (1990) The effect of von Willebrand's factor on activation of factor-VIII by factor Xa. *Eur J biochem* 189: 229

Koppelman SJ, Vanhoeij M, Vink T, Lankhof H, Schiphorst ME, Damas C, Vlot AJ, Wise R, Bouma BN, Sixma JJ. (1996) Requirements of von Willebrand factor to protect factor VIII from inactivation by activated protein C. *Blood* 87: 2292

Kroner PL, Kluessendorf ML, Scott JP, Montgomery RR. (1992) Expressed full-length von Willebrand factor containing missense mutations linked to type IIB von Willebrand disease shows enhanced binding to platelets. *Blood* 79: 2048

Kroner PA, Foster PA, Fahs SA, Montgomery RR. (1996) The defective interaction between von Willebrand factor and FVIII in a patient with type 1 von Willebrand disease is caused by substitution of Arg19 and His54 in mature von Willebrand factor. *Blood* 87: 1013

Layet S, Girma JP, Obert B, Peynaud-Debayle E, Bihoreau N, Meyer D. (1992) Evidence that a secondary binding and protecting site for factor VIII on von Willebrand factor is highly unlikely. *J Biochem* 282: 129

Lenting PJ, Van Mourik JA, Mertens K. (1998) The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* 92: 3983

Lethagen S, Frick K, Isaksson C, Kristoffersson AC, Holmberg L. (1998) Revised classification and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 80: 199

Lyons SE, Bruck ME, Bowie EJ, Ginsburg D. (1992) Impaired intracellular transport produced by a subset of type IIA von Willebrand disease mutations. *J Biol Chem* 267: 4424

Lynch DC, Zimmerman TS, Collins CJ, Brown M, Morin MJ, Ling EH, Livingston DM. (1985) Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: authentication by a new method. *Cell* 41: 49

Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG, Sadler JE. (1989) Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 264: 19524

Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester-Mancuso TL, Lebeau MM, Sorace JM, Sadler JE. (1991) Human von Willebrand factor gene and pseudogene. Structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 30: 253

Mancuso DJ, Kroner PA, Christopherson PA, Vokac EA, Gil JC, Montgomery RR. (1996) Type 2M:Milwaukee-1 von Willebrand disease: an inframe deletion in the Cys509-Cys695 loop of von Willebrand factor A1 domain causes deficient binding of von Willebrand factor to platelets. *Blood* 88: 2559

Mannucci PM, Lombardi R, Castaman G, Dent JA, Lattuada A, Rodeghiero F, Zimmerman TS. (1988) Von Willebrand disease "Vicenza" with larger-than-normal (supranormal) von Willebrand factor multimers. *Blood* 71: 65

Mannucci PM, Bettaga D, Cattaneo M. (1992) Patterns of development of tachyphylaxis in patients with haemophilia and von Willebrand disease after repeated doses of desmopressin (DDAVP). *Br J Haematol* 82: 87

Marti T, Rosselet SJ, Titani K, Walsh KA. (1987) Identification of disulfide-bridges substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry USA* 26: 8099

Matsushita T, Sadler JE. (1995) Identification of amino acid residues essential for von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib. Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the A1 domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 270: 13406

Matsushita T, Meyer D, Sadler JE. (2000) Localization of von Willebrand factor-binding sites for platelet glycoprotein Ib and botrocetin by charged-to-alanine scanning mutagenesis. *J Biol Chem* 275: 11044

Mazurier C. (1989) Purification, biochemistry and structure/function relationships of vWF. In : Seghatchian MJ, Savidge GF, eds. *FVIII-vWF*. London: CRC press, 1: 41

Mazurier C (1992) Von Willebrand disease masquerading as haemophilia A. *Thromb Haemost* 67: 391

Mazurier C, Meyer D. (1996) Factor VIII binding assay of von Willebrand factor and the diagnosis of type 2N von Willebrand disease – Results of an international survey. *Thromb Haemost* 76: 270

Mazurier C, Diéval J, Jorieux S, Delobel J, Goudemand M. (1990) A new von Willebrand factor defect in a patient with factor VIII deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet VWF. Characterization of abnormal VWF/FVIII interaction. *Blood* 75: 20

Mazzucato M, Spessotto P, Masotti A, de Appollonia L, Cozzi MR, Yoshioka A, Perris R, Colombatti A, de Marco L. (1999) Identification of domains responsible for von Willebrand factor type VI collagen interaction mediating platelet adhesion under high flow. *J Biol Chem* 274: 3033

McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW, Hedner U, Ezban M. (1995) Locations of disulfide bonds and free cysteines in the heavy and light chains of recombinant factor VIII (antihemophilic factor A). *Protein Sci* 4: 740

Meyer D, Girma JP (1993) Von Willebrand factor: structure and function. *Thromb Haemost* 70: 99

Mikaelian I, Sergeant A. (1992) A general and fast method to generate multiple site directed mutations. *Nucleic Acids Res* 20: 376

Mohri H, Fujimura Y, Shima M, Yoshioka A, Houghten RA, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. (1988) Structure of von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 263: 17901

Nishino M, Girma JP, Rothschild C, Fressinaud E, Meyer D. (1989) New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* 74: 1591

Obert B, Houllier A, Meyer D, Girma JP. (1999) Conformational changes in the A3 domain of von Willebrand factor modulates the interaction of the A1 domain with platelet glycoprotein Ib. *Blood* 93: 1959

Rabinowitz I, Tuley EA, Mancuso DJ, Randi AM, Firkin BG, Howard MA, Sadler JE. (1992) Von Willebrand disease type B: A missense mutation selectively abolishes ristocetin-induced von Willebrand binding to platelet glycoprotein Ib. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9846

Randi AM, Jorieux S, Tuley EA, Mazurier C, Sadler JE. (1992) Recombinant von Willebrand factor Arg578→Gln. A type IIB von Willebrand disease mutation affects binding to glycoprotein Ib but not to collagen or heparin. *J Biol Chem* 267: 21187

Read MS, Shermer RW, Brinkhous KM. (1978) Venom coagglutinin: An activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4514

Ribba AS, Voorberg J, Meyer D, Pannekoek H, Piétu G. (1992) Characterization of recombinant von Willebrand factor corresponding to mutations in type IIA and type IIB von Willebrand disease. *J Biol Chem* 267: 23209

Ribba AS, Christophe O, Derlon A, Cherel G, Siguret V, Lavergne JM, Girma JP, Meyer D, Piétu G. (1994) Discrepancy between IIA phenotype and IIB genotype in a patient with a variant of von Willebrand disease. *Blood* 83: 833

Ribba AS, Hilbert L, Lavergne JM, Fressinaud E, Boyer-Neumann C, Ternisien C, Juhan-Vague I, Goudemand J, Girma JP, Mazurier C, Meyer D. (2001) The arginine-552-Cysteine (R1315C) mutation within the A1 loop of von Willebrand factor induces an abnormal folding with a loss of function resulting in type 2A-like phenotype of von Willebrand disease: study of 10 patients and mutated recombinant von Willebrand factor. *Blood* 97: 952

Sadler JE. (1994) A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 71: 520

Sadler JE, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Harlan JM, Titani K, Davie EW. (1985) Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6394

Samor B, Michalski JC, Mazurier C, Goudemand M, de Waard P, Vliegenhart JF, Strecker G, Montreuil J. (1989) Primary structure of the major O-glycosidically linked carbohydrate unit of human von Willebrand factor. *Glucoconj* 6: 263

Schneppenheim R, Thomas KB, Krey S, Budde U, Jessat U, Sutor AH, Zieger B. (1995) Identification of a candidate missense mutation in a family with von Willebrand disease type IIC. *Hum Genet* 95: 681

Schneppenheim R, Brassard J, Krey S, Budde U, Kunicki TJ, Holmberg L, Ware J, Ruggeri ZM. (1996) Defective dimerization of von Willebrand factor subunits due to a Cys→Arg mutation in type IID von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3581

Schneppenheim R, Federici AB, Budde U, Castaman G, Drewke E, Krey S, Mannucci PM, Riesen G, Rodeghiero F, Zieger B, Zimmermann R. (2000) Von Willebrand disease type 2M "Vicenza" in Italian and German patients: identification of the first candidate mutation (G3864A; R1205H) in 8 families. *Thromb Haemost* 82: 136

Schulte am Esch II J, Robson SC, Cruz MA. (2003) Platelet aggregation by membrane-expressed A1 domains of von Willebrand factor is dependent on residues Asp560 and Gly561. *Biochem Biophys Res Commun* 302: 873

Scott JP, Montgomery RR, Retzinger GS. (1991) Dimeric ristocetin flocculates proteins, binds to platelets and mediates von Willebrand factor-dependent agglutination of platelets. *J Biol Chem* 266: 8149

Shelton-Inloes BB, Titani K, Sadler JE. (1986) cDNA sequence for human von Willebrand factor reveals five types of repeated domains and five possible protein sequence polymorphisms. *Biochemistry* 25: 3164

Sixma JJ, Schiphorst ME, Verweij CL, Pannekoek H. (1991) Effect of deletion of the A1-Domain of von Willebrand factor on its binding to heparin, collagen and platelets in the presence of ristocetin. *Eur J Biochem* 96: 369

Sixma JJ, van Zanten GH, Huizinga EG, van der Plas RM, Verkley M, Wu YP, Gros P, de Groot PG. (1997) Platelet adhesion to collagen: an update. *Thromb Haemost* 78: 434

Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, Wagner DD. (1985) Biosynthesis of von Willebrand protein by human megacaryocytes. *J Clin Invest* 76: 1102

Sugimoto M, Mohri H, Mc Clintock RA, Ruggeri ZM. (1991) Identification of discontinuous von Willebrand factor sequences involved in complex formation with botrocetin. *J Biol Chem* 266: 18172

Sugimoto M, Dent J, Mc Clintock R, Ware J, Ruggeri ZM. (1993) Analysis of structure-function relationships in the platelet membrane glycoprotein Ib-binding domain of von Willebrand's factor by expression of deletion mutants. *J Biol Chem* 268: 12185

Takahashi Y, Kalafatis M, Girma JP, Sewerin K, Andersson LO, Meyer D. (1987) Localization of a factor VIII binding domain on a 34 kilodalton fragment of the N-terminal portion of von Willebrand factor. *Blood* 70: 1679

Titani K, Kumar S, Takio K, Ericsson LH, Wade RD, Ashida K, Walsh KA, Chopek MW, Sadler JE, Fujikawa K. (1986) Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* 25: 3171

Tsai HM. (1996) Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 87: 4235

Varughese KI, Celikel R, Ruggeri ZM. (2002) Structure and function of the von Willebrand factor A1 domain. *Current Protein and peptide Science* 3: 301

Vasudevan S, Roberts JR, McClintock RA, Dent JA, Celikel R, Ware J, Varughese KI, Ruggeri ZM. (2000) Modeling and functional analysis of the interaction between von Willebrand factor A1 domain and glycoprotein Ib α . *J Biol Chem* 275: 12763

Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI, Harkins RN. (1984) Structure of human FVIII. *Nature* 312: 337

Verweij CL, De Vries CJM, Distel B, van Zonnenveld AJ, van Kessel AG, van Mourik JA, Pannekoek H. (1985) Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene. *Nucleic Acids Res* 13: 4699

Vlot AJ, Koppelman SJ, Meijers JCM, Damas C, Vandenberg HM, Bouma BN, Sixma JJ, Willems GM. (1996) Kinetics of factor VIII-von Willebrand factor association. *Blood* 87: 1809

Vlot AJ, Koppelman SJ, Bouma BN, Sixma JJ. (1998) Factor VIII and von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 79: 456

Von Willebrand E. (1926) Hereditär pseudohemofili. *Finska Läkarsällskapets Handlingar*. 67: 7

Wagner DD. (1990) Cell Biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 6: 217

Weiss HJ, Hawiger J, Ruggeri ZM, Turitto VT, Thiagarajan P, Hoffmann T. (1989) Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium mediated by glycoprotein IIb/IIIa complex at high shear rate. *J Clin Invest* 83: 288

Wise RJ, Pittman DD, Handin RI, Kaufman RJ, Orkin SH. (1988) The propeptide of von Willebrand factor independently mediates assembly of von Willebrand multimers. *Cell* 52: 229

Zimmerman TS, Dent JA, Ruggeri ZM, Nannini LH. (1986) Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers. *J Clin Invest* 77: 947