

50376
1983
120

N° d'ordre : 578

50376
1983
120

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

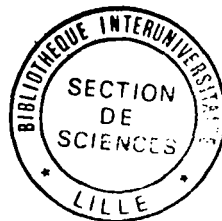
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

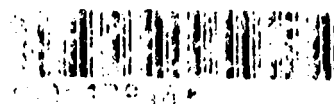
Claudine MAZURIER-DEHAINE

**ETUDE IMMUNOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DU
F VIII/vWF PLASMATIQUE HUMAIN**



Présentée le 17 mars 1983 devant la Commission d'Examen

Président : J. MONTREUIL
Rapporteurs : J. CAEN
M. GOUDEMAND
A. VERBERT
Examineurs : D. MEYER
G. SPIK





DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERJET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNOT Ernest	Biologie végétale

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FOURET René	Physique du solide
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie physique

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, électrotechnique, automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre

Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences économiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé-
M. MAHIEU Jean Marie	Physique atomique et moléculaire. • riques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. RCGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean Paul	Physiologie animale
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétiq ue
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique

M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Géologie générale
Informatique fondamentale appliquée
Hydrométallurgie
Algèbre

A mes parents,

avec toute mon affection et ma profonde gratitude

A mon frère,

à Joël,

à Peggy et Quentin.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL,

c'est grâce à vous, personnellement, et à l'expérience que j'ai pu acquérir au cours des quelques années passées dans votre laboratoire, que je fais partie, depuis plus de dix ans, du personnel du C.R.T.S. de Lille. Je vous en suis particulièrement reconnaissante.

Vous m'avez aidée de vos conseils et encouragée par l'exemple de votre enthousiasme et de votre dynamisme, vous avez dirigé la partie purement biochimique de ce travail avec votre haute compétence scientifique notamment dans le domaine de la structure des glycoprotéines ; croyez en ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur M. GOUEMAND,

que cette thèse soit un témoignage de ma profonde gratitude et de mon respect. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez toujours accordée, en me faisant partager les responsabilités du Laboratoire d'Hémostase, et de l'aide permanente que vous m'avez prodiguée. Vos connaissances, non seulement dans le domaine de l'Hémostase, mais dans celui de l'Hématologie et de la Transfusion Sanguine provoquent mon admiration. Tout au long de ce travail, vous m'avez conseillée et dirigée en étant toujours disponible, malgré vos nombreuses responsabilités. Je vous prie de croire à mon profond respect et à mon attachement.

A Monsieur le Professeur J. CAEN,

Vos travaux sur les plaquettes et la thrombose sont internationalement connus. Vous nous avez accordé l'aide de votre équipe pour débiter un travail sur l'étude de la fixation du FvWf aux plaquettes ; j'espère que ce travail sera fructueux.

Je ressens avec fierté l'honneur que vous me faites de juger cette thèse.

A Monsieur le Professeur A. VERBERT,

André, par tes travaux sur les sialyl-transférases, tu as été amené à t'intéresser aux plaquettes. Tu as également assuré la conduite de l'étude du FVIII/vWf par ultracentrifugation analytique. J'ai toujours trouvé auprès de toi un accueil bienveillant, je t'exprime mon amicale reconnaissance pour avoir bien voulu compter parmi les rapporteurs de cette thèse.

A Madame le Docteur D. MEYER,

Vous m'avez fait le grand honneur d'accepter de juger ce travail. Votre autorité scientifique incontestée, votre personnalité et vos travaux sur le FVIII/vWf me font solliciter votre indulgence. Je vous remercie également de l'aide précieuse que vous avez bien voulu m'accorder pour la mise au point du dosage immunologique du FVIII.

Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon admiration.

A Mademoiselle le Professeur G. SPIK,

Geneviève, c'est toi qui m'as initiée à la recherche. Ton exemple, pendant quelques années, de chercheur passionné et tes qualités humaines que j'ai pu apprécier encore par la suite font que je suis doublement heureuse que tu aies accepté de juger mon travail. Crois à ma sincère gratitude.

J'adresse également mes sincères remerciements

A Madame le Docteur A. PARQUET-GERNEZ qui m'a fait, depuis mon arrivée dans son laboratoire, bénéficier de ses connaissances dans le domaine de l'Hémostase. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir accordé sa confiance et son amitié.

A Monsieur Bruno SAMOR avec qui une partie de ce travail a été réalisé. Sa compétence technique, son esprit de collaboration et son expérience dans l'étude des glycanes ont été particulièrement précieux.

A toutes les techniciennes et techniciens du Laboratoire d'Hémostase, et particulièrement à Madame Véronique BARYLO et Madame Thérèse GREGORCIC, qui, plus ou moins directement, m'ont aidée durant ces dix années.

A Monsieur Jacques DESCAMPS qui m'a fait bénéficier de ses connaissances dans les analyses immunoélectrophorétiques, notamment pour la caractérisation des immunoglobulines.

Aux secrétaires qui ont participé à l'élaboration de ce mémoire et particulièrement à Madame Virginia DIEVAL qui a assuré, avec excellence, la dactylographie de cette thèse.

A tous ceux qui m'ont accordé leur collaboration, leur aide et leur amitié.

TABLE DES MATIERES

— <u>INTRODUCTION</u>	P. 0
— <u>GÉNÉRALITÉS</u>	
<u>HISTORIQUE</u>	P. 3
<u>LE COMPLEXE FACTEUR VIII/vWF</u>	P. 7
I - <u>ROLE BIOLOGIQUE DU F VIII/vwf</u>	p. 9
A - <u>ROLE DANS LA COAGULATION = L'ACTIVITE VIII:C</u>	p. 9
B - <u>ROLE DANS L'HEMOSTASE PRIMAIRE</u>	p. 12
1 - Interaction plaquettes/sous-endothélium vasculaire.....	p. 12
2 - Fixation du F VIII/vwf au sous-endothélium.....	p. 13
3 - Fixation du F VIII/vwf aux plaquettes.....	p. 14
a) sur des plaquettes "natives".....	p. 14
b) en présence de ristocétine.....	p. 14
c) sur des plaquettes activées.....	p. 16
II - <u>PURIFICATION DU F VIII/vwf</u>	p. 17
A - <u>PREPARATION DE FRACTIONS THERAPEUTIQUES "ENRICHIES" EN F VIII/vwf</u>	p. 17
B - <u>ISOLEMENT DE F VIII/vwf HAUTEMENT PURIFIE</u>	p. 18
III - <u>PROPRIETES BIOCHIMIQUES DU F VIII/vwf</u>	p. 20
A - <u>MASSE MOLECULAIRE DU F VIII/vwf purifié</u>	p. 20
1 - Résultats obtenus par tamisage moléculaire.....	p. 20
2 - Résultats obtenus par ultracentrifugation.....	p. 21
a) ultracentrifugation en gradient de densité...	
b) ultracentrifugation analytique.....	
3 - Résultats obtenus par "disc-electrophoresis"....	p. 21
4 - Résultats obtenus en microscopie électronique... p. 22	
B - <u>MASSE MOLECULAIRE DU F VIII/vwf NATIF</u>	p. 23
1 - Arguments en faveur d'une $MM > 0,5 \times 10^6$ daltons. p. 23	
2 - Arguments en faveur d'une $MM < 0,5 \times 10^6$ daltons. p. 24	
C - <u>SOUS-UNITES OBTENUES EN MILIEU REDUCTEUR</u>	p. 25
D - <u>SOUS-UNITES OBTENUES EN MILIEU DE FORCE IONIQUE ELEVEE</u>	p. 28
E - <u>AUTRES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU F VIII/vwf</u> ... p. 29	
1 - Mobilité électrophorétique.....	p. 29
2 - Absorption en lumière ultra-violette.....	p. 29



F - <u>COMPOSITION CHIMIQUE</u>	p. 31
1 - Copule protéique.....	p. 31
2 - Copule glycanique.....	p. 31
3 - Copule lipidique.....	p. 31
IV - <u>IMMUNOLOGIE DU F VIII/vwf</u>	p. 36
A - <u>OBTENTION DES ANTICORPS HETEROLOGUES</u>	p. 38
B - <u>PROPRIETES DES ANTICORPS HETEROLOGUES</u>	p. 39
1 - Anticorps monoclonaux.....	p. 39
2 - Anticorps polyclonaux.....	p. 39
a) anticorps dirigés contre le F VIII.....	p. 39
b) anticorps dirigés contre le F vwf.....	p. 41
LE FACTEUR WILLEBRAND	p. 44
I - <u>SYNTHESE DU F vwf</u>	p. 45
A - <u>LOCALISATION TISSULAIRE DU VIII R:Ag</u>	p. 45
B - <u>SYNTHESE DU FvWF PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES EN...</u> CULTURE.....	p. 45
C - <u>DEVENIR DU FvWF SYNTHETISE PAR LES CELLULES ENDOTHE-</u> LIALES.....	p. 46
D - <u>REGULATION DE L'EXCRETION DU F vwf DANS LE SANG</u>	p. 48
II - <u>BIOCHIMIE DU F vwf</u>	p. 49
A - <u>ISOLEMENT DE F vwf DEPOURVU DE F VIII</u>	p. 49
B - <u>STRUCTURE DU F vwf</u>	p. 50
III - <u>IMMUNOLOGIE DU F vwf</u>	p. 53
A - <u>LES ANTICORPS HETEROLOGUES</u>	p. 53
B - <u>LES ANTICORPS HOMOLOGUES</u>	p. 53
1 - Chez les vWD homozygotes.....	p. 54
2 - Dans la maladie de Willebrand acquise.....?	p. 55
IV - <u>TECHNIQUES DE DOSAGE DU F vwf</u>	p. 56
A - <u>DOSAGES IMMUNOLOGIQUES</u>	p. 56
B - <u>DOSAGES BIOLOGIQUES</u>	p. 58
1 - Principe de dosage du VIII R:RCo.....	p. 58
2 - Techniques de dosage du VIII R:RCo.....	p. 59
3 - Limites du dosage du VIII R: RCo.....	p. 59

V	- <u>PATHOLOGIE LIEE AU F vwf</u>	p. 61
A	- <u>DONNEES PHYSIO-PATHOLOGIQUES</u>	p. 61
B	- <u>CLASSIFICATION BIOLOGIQUE DE LA MALADIE DE WILLE-... BRAND</u>	p. 62
C	- <u>ROLE DU F vwf DANS L'ATHEROSCLEROSE</u>	p. 66
VI	- <u>RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DU F vwf</u>	p. 68
A	- <u>STRUCTURE SPATIALE/ ACTIVITE VIII R:vwf</u>	p. 68
	1 - Etude du F vwf modifié.....	p. 68
	2 - Etude chez les vWD.....	p. 69
	3 - Comparaison des 2 types d'expérimentations.....	p. 69
B	- <u>COPULE GLYCANNIQUE/ACTIVITE VIII R:vwf</u>	p. 71
	1 - Etude chez les vWD.....	p. 71
	2 - Etude du F vwf modifié.....	p. 73

LE FACTEUR VIII p. 76

I	- <u>SYNTHESE DU F VIII</u>	p. 77
A	- <u>LES CELLULES ENDOTHELIALES</u>	p. 77
B	- <u>LE FOIE</u>	p. 78
C	- <u>LES LEUCOCYTES</u>	p. 79
D	- <u>LA RATE</u>	p. 79
E	- <u>AUTRES LIEUX DE SYNTHESE</u>	p. 79
II	- <u>BIOCHIMIE DU F VIII</u>	p. 81
A	- <u>DIFFICULTES D'ISOLEMENT</u>	p. 81
B	- <u>MASSE MOLECULAIRE</u>	p. 81
C	- <u>AUTRES PROPRIETES</u>	p. 83
III	- <u>IMMUNOLOGIE DU F VIII</u>	p. 84
A	- <u>LES ANTICORPS HOMOLOGUES</u>	p. 84
	1 - Circonstances d'apparition.....	p. 84
	2 - Propriétés.....	p. 85
	a) action sur le F VIII.....	p. 85
	b) action sur le F vwf.....	p. 88
	3 - Nature.....	p. 89
	a) chez les hémophiles.....	p. 90
	b) chez les "non-hémophiles".....	p. 90

B - <u>LES ANTICORPS HETEROLOGUES</u>	p. 91
1 - Anticorps polyclonaux.....	p. 91
2 - Anticorps monoclonaux.....	p. 92
IV - <u>DOSAGES DU F VIII</u>	p. 93
A - <u>DOSAGES DE L'ACTIVITE VIII:C</u>	p. 93
1 - Technique en 1 temps.....	p. 93
2 - Technique en 2 temps.....	p. 94
3 - Problèmes rencontrés.....	p. 94
B - <u>DOSAGES IMMUNOLOGIQUES DU F VIII</u>	p. 95
V - <u>PATHOLOGIE LIEE AU F VIII</u>	p. 97
A - <u>L'HEMOPHILIE A CLASSIQUE</u>	p. 97
B - <u>AUTRES FORMES D'HEMOPHILIE A</u>	p. 98
VI - <u>RELATIONS STRUCTURE-FONCTION DU F VIII</u>	p. 99
— <u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	p. 102
ETUDE IMMUNOLOGIQUE DU F VIII/vWF	p. 108
I - ACTION DES ANTICORPS ANTI-FACTEUR VIII SUR LA RETENTION DES PLAQUETTES AUX BILLES DE VERRE.....	p. 109
II - ACTION DES ANTICORPS HOMOLOGUES ANTI-FACTEUR VIII INSOLUBI- LISES SUR L'ANTIGENE LIE AU FACTEUR VIII.....	p. 115
III - DEPISTAGE DES CONDUCTRICES DE L'HEMOPHILIE A PAR DOSAGE COMPARATIF DE L'ACTIVITE ET DE L'ANTIGENICITE FACTEUR VIII	p. 126
IV - DOSAGE DE L'ANTIGENE LIE AU FACTEUR VIII PAR LA TECHNIQUE ELISA. INTERET DANS L'ETUDE DE LA MALADIE DE WILLEBRAND..	p. 135
V - MALADIE DE WILLEBRAND ACQUISE AU COURS D'UNE MALADIE DE WALDENSTRÖM.....	p. 145
ETUDE BIOCHIMIQUE DU F VIII/vWF	p. 153
I-CONTRIBUTION A L'ISOLEMENT ET A L'ETUDE DE LA MASSE MOLECU- LAIRE DU FACTEUR VIII HUMAIN.....	p. 154

II - ETUDE D'UN CONCENTRE THERAPEUTIQUE DU FACTEUR VIII/vwf PREPARE EN CIRCUIT CLOS.....	p. 163
III - ETUDE DE L'ANTIGENE LIE AU FACTEUR VIII (F VIII R:Ag) - PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE.....	p. 184
IV - COMPOSITION CHIMIQUE DU F VIII	p. 190
V - RESULTATS PRELIMINAIRES SUR LA COPULE GLYCANNIQUE DU F VIII/vwf	p. 197
VI - ACTIVITE DE GROUPE A ET B ASSOCIEE AU FACTEUR VIII/FACTEUR WILLEBRAND.....	p. 210
VII - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DU N-GLYCANNE MAJEUR DU FACTEUR VIII/vwf HUMAIN	p. 220
— <u>CONCLUSIONS</u>	p. 233
— <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p. 238

LISTE DES ABREVIATIONS

- A H A : Antihémophilique A
- A H G : Globuline antihémophilique
- A H F : Facteur antihémophilique
- Con A : Concanavaline A
- D E A E Sephadex : Diethylaminoethyl-Sephadex - Résine d'échangeuse d'anions
- D F P : Diisopropyl-fluorophosphate
- D T T : Di-thio-threitol
- FvWf : Facteur de von Willebrand
- FVIII : Facteur antihémophilique A
- FVIII/vWf : Complexe formé des facteurs VIII et von Willebrand
- FVIII:C, VIIIIR:Ag, VIIIIR:RCo, VIIIIR:vWf, VIII CAg : Voir terminologie p. 8
- GuHCl : Chlorhydrate de guanidine
- H M W : Partie du FVIII/vWf, de masse moléculaire élevée, dissociée en milieu de force ionique élevée = FvWf
- L M W : Partie du FVIII/vWf, de masse moléculaire faible, dissociée en milieu de force ionique élevée = FVIII
- P A S : Réactif de Schiff à l'acide périodique
- P P P : Plasma pauvre en plaquettes
- P R P : Plasma riche en plaquettes
- S D S : Dodecyl-sulfate de sodium
- T S : Temps de saignement
- U : Unité : par définition, 1 ml de plasma renferme 1 unité de VIII:C, VIIIIR:Ag, VIIIIRCo, VIII:CAg
- U anti-VIII:C : 1 Unité Bethesda inhibe 0,5 U de FVIII:C en 2h à 37° C
- Vo : Volume d'exclusion ou volume mort des colonnes de tamisage moléculaire
- V H M W : Formes très polymérisées du FvWf
- vWD : Maladie de Willebrand.

I N T R O D U C T I O N



Des progrès considérables ont été réalisés ces vingt dernières années dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques de l'hémostase*. Ainsi, de nombreux facteurs de coagulation ont pu être identifiés d'abord par leur activité coagulante, puis ultérieurement par leurs propriétés antigéniques, et plus récemment encore, par leur composition et structure biochimique. Parmi les facteurs ainsi étudiés, le facteur VIII est celui qui a posé, et continue à poser, les problèmes les plus complexes. Or son importance en pathologie est considérable puisque son déficit conditionne tout à la fois cette redoutable affection qu'est l'hémophilie A, la plus fréquente et la plus grave des maladies hémorragiques génotypiques, et la maladie de Willebrand plus récemment connue.

* L'hémostase désigne l'ensemble des phénomènes physiologiques qui permettent l'arrêt des hémorragies survenant à la suite d'une lésion de l'endothélium vasculaire. Elle comprend plusieurs étapes qui s'imbriquent les unes les autres :

- l'hémostase primaire (ou temps vasculo-plaquettaire) qui aboutit à la formation d'un thrombus au niveau de la brèche vasculaire.

- la coagulation sanguine (ou temps plasmatique) qui donne lieu à la formation d'un réseau de fibrine^{qui} va renforcer considérablement le thrombus primitif. Ce mécanisme qui aboutit à la transformation du fibrinogène, protéine soluble, en fibrine insoluble, est très complexe et met en jeu de nombreux facteurs de coagulation qui sont soit des enzymes, soit des cofacteurs.

L'hémostase est suivie de la fibrinolyse qui va faire disparaître le caillot en même temps que l'on assiste à la reconstitution de la paroi vasculaire.

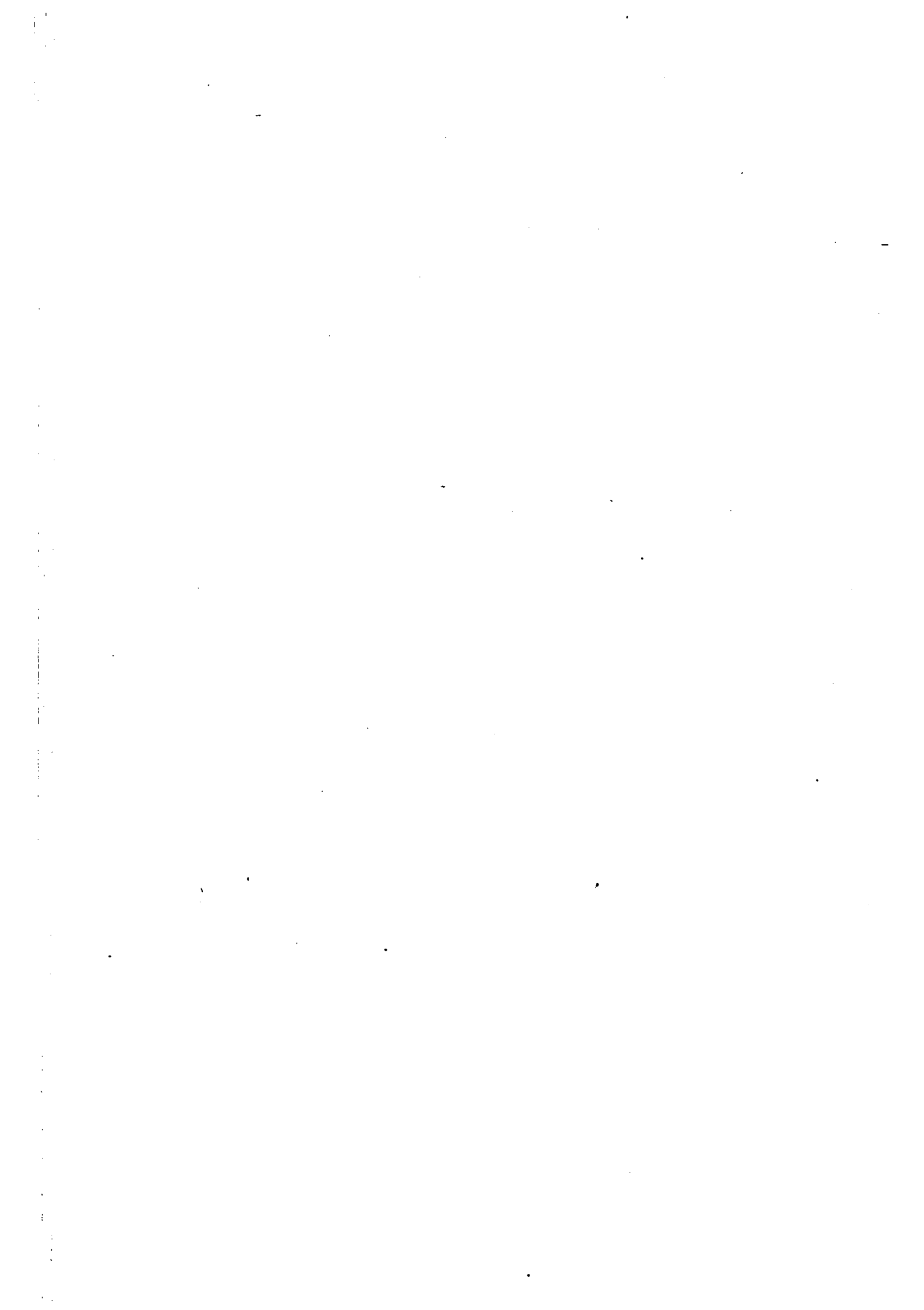
L'étude de ces affections a semblé montrer que le facteur VIII est synthétisé sous la dépendance d'au moins deux gènes, l'un situé sur le chromosome X, l'autre sur un autosome, qu'il joue un rôle fondamental non seulement dans la coagulation sanguine mais également dans l'hémostase primaire, au niveau de l'interaction plaquettes/paroi vasculaire et que ses propriétés antigéniques sont différentes suivant que l'on s'adresse à un système homologue ou hétérologue. En fait, les travaux de ces dernières années ont permis de lever en partie ces apparentes contradictions en montrant que le facteur VIII du plasma, responsable de l'activité coagulante, est associé à une autre molécule, de poids moléculaire élevé : le facteur Willebrand (F vWf) intervenant dans l'hémostase primaire. C'est à l'étude de ce complexe F VIII/vWf que nous nous sommes attachés.

Ce mémoire rapporte l'essentiel des travaux que, sous la direction du Professeur M. GOUDEMANT, nous avons effectué depuis 10 ans dans le Laboratoire d'Hémostase du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille. Ils s'inscrivent dans la ligne des recherches, poursuivies depuis une vingtaine d'années dans ce laboratoire, et consacrées aux problèmes théoriques et pratiques de l'hémophilie et de la maladie de Willebrand. Elles avaient permis, entre autres résultats, d'apporter une des premières démonstrations des propriétés antigéniques du facteur VIII jusqu'alors défini uniquement par son activité coagulante. C'est ainsi que nous avons pu bénéficier de l'expérience acquise, dans les diverses techniques d'identification du facteur VIII et du facteur Willebrand, par Madame le Docteur A. PARQUET-GERNEZ et Madame A. MOURIER-FECELLE. Nous avons également eu la possibilité d'étudier de très nombreux échantillons de sang pathologiques, grâce à la très active consultation des maladies hémorragiques fonctionnant dans le cadre même du Centre de Transfusion.


La tâche majeure qui nous a été confiée, et dont nous ne dissimulons pas le caractère très ambitieux, était de préciser la composition biochimique du complexe F VIII/vWf et de déterminer les relations existant entre sa structure et ses diverses activités physiologiques. Dans un premier temps, nous avons poursuivi les travaux du laboratoire en améliorant les techniques immunologiques de dosage du F vWf et en procédant à l'étude comparée de l'action des anticorps hétérologues et homologues sur le F VIII et F vWf. Parallèlement, nous nous sommes attachés au problème de l'isolement du F VIII/vWf

et du contrôle de la pureté et de l'activité biologique des préparations obtenues. Ces travaux étaient un préalable nécessaire à l'étude biochimique de ces molécules et ils ont, en outre, permis la mise au point d'un procédé de fabrication des fractions thérapeutiques destinées aux hémophiles A et aux patients atteints de maladie de Willebrand. Enfin, nous avons, dans le cadre d'un travail fait en collaboration avec le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I, sous la direction du Professeur J. MONTREUIL, contribué à l'étude de la composition chimique et de la structure de la copule glycanique du F VIII/vWf.

L'exposé de nos travaux personnels consacrés au F VIII/vWf qui ont fait l'objet de 14 publications (p.102), comportera donc deux parties : l'une d'orientation immunologique, l'autre plus biochimique. Il est précédé d'un chapitre dans lequel nous rappellerons tout d'abord l'état actuel des connaissances sur le F VIII/vWf, le F vWf et le F VIII. Celles-ci ayant progressé rapidement au cours de ces dernières années, nous indiquerons au passage les problèmes qui se posaient au moment où nous avons entrepris nos recherches.



GENERALITES



HISTORIQUE

Les premières observations concernant des sujets atteints de désordres hémorragiques qu'on peut, a posteriori, attribuer à un déficit en facteur VIII, sont retrouvées dans le Talmud (V siècle) et les écrits des rabbins (1) qui signalent des hémorragies fatales lors de la circoncision de certains jeunes garçons apparentés. Le terme d'hémophilie, employé la première fois en 1828, par HOPFF (2) désigne alors une maladie hémorragique congénitale qui atteint les sujets de sexe masculin mais est transmise par les femmes. Cette maladie est mise en évidence par WRIGHT (3) en 1893 qui met au point le premier test biologique explorant l'hémostase : le temps de coagulation. ADDIS (4) qui démontre, en 1911, la correction "in vitro" de ce temps de coagulation par addition de plasma normal, et PATEK et STETSON (5) qui, plus tard, constatent que le temps de coagulation de l'hémophile se raccourcit après transfusion avec du sang de donneur sain, font la preuve que l'hémophilie est due à un déficit d'un facteur plasmatique. En 1937, PATEK et TAYLOR (6) mettent en évidence le caractère euglobulinique de ce facteur et l'appellent AHG (Antihemophilic Globulin).

Dans les années 50, PAVLOVSKY (7) fait la preuve qu'il existe en fait deux types différents d'hémophiles, et AGGELER et al. (8) montrent que le sang ou le plasma des uns peut corriger les anomalies de coagulation des autres. L'hémophilie classique, la plus fréquente, appelée ultérieurement hémophilie A, est due au déficit en AHG qui est appelé également facteur antihémophilique A (AHF) puis, à partir de l'établissement en 1959 de la nomenclature internationale des facteurs

de coagulation, facteur VIII. L'autre type d'hémophilie, appelée également "Christmas disease" est de type B ; elle est due à un déficit d'un autre facteur de coagulation, se distinguant du facteur VIII par le fait qu'il est absorbable sur sulfate de baryum et que sa synthèse dépend de la vitamine K. Ce facteur antihémophilique B s'est appelé successivement PTC (Plasma Thromboplastin Component), facteur Christmas et facteur IX.

En 1953, ALEXANDER et GOLDSTEIN (9), LARRIEU et SOULIER (10), QUICK et HUSSEY (11) publient les observations de malades chez qui, à une diminution du facteur antihémophilique A, est associé un allongement du temps de saignement. Cette maladie qui s'avère identique à celle décrite une vingtaine d'années auparavant par Eric Von Willebrand est alors appelée maladie de Willebrand (vWD).

En effet, dès 1926, Von Willebrand (12) avait rapporté l'observation d'une maladie hémorragique qu'il avait appelée "pseudo-hémophilie" qui se distinguait des autres maladies hémorragiques déjà connues de par son caractère congénital affectant les deux sexes, le type de syndrome hémorragique et l'allongement du temps de saignement malgré une numération des plaquettes et une rétraction du caillot normales. Cette maladie affectant 23 des 66 membres de la famille d'une jeune fille de l'île Åland qui fut le cas princeps, avait été attribuée, à la suite d'une étude faite plus tard en collaboration par Von WILLEBRAND et JURGENS (13), à une thrombopathie constitutionnelle.

Dans la période qui suivit (1955-1970) s'établit plus précisément le diagnostic différentiel entre hémophilie A et maladie de Willebrand (Tableau I p. 5) : le déficit en facteur VIII est vérifié chez les patients de l'île Åland par NILSSON et al. (14) et JURGENS et al. (15) ; la maladie de Willebrand est observée dans de nombreux pays et on montre qu'elle est caractérisée également par un défaut de l'adhésion des plaquettes "in vivo" aux lèvres de la plaie (BORCHGREVINK 16) et "in vitro" aux billes de verre (SALZMAN : 17). Les différentes anomalies biologiques observées dans cette maladie sont corrigées, du moins transitoirement, par l'injection de plasma normal (ou même d'hémophile A) qui apporte à la fois le facteur VIII et le facteur ayant un rôle dans l'hémostase primaire et qu'on dénomme facteur Willebrand (F vWf).

TABLEAU I
PRINCIPALES CARACTERISTIQUES, CONNUES EN 1970, de l'HEMOPHILIE A MAJEURE ET DE LA MALADIE DE VON WILLEBRAND SEVERE.

	MALADIE DE WILLEBRAND (vWD)	HEMOPHILIE A (HA)
<u>Transmission</u>	Autosomale	Liée au chromosome X
<u>Syndrome hémorragique</u>	Hémorragies spontanées, Localisations cutanéomuqueuses.	Hémorragies provoquées, Localisations musculaires articulaires.
<u>Anomalies biologiques</u>		
- temps de coagulation	normal	allongé
- temps de saignement	allongé	normal
- activité coagulante liée au facteur VIII	diminuée	absente
- adhésion des plaquettes	diminuée ou nulle	normale
<u>Transfusions</u>	Correction par injection de plasma normal ou d'HA	Correction par injection de plasma normal mais pas d'amélioration avec plasma de vWD.



TABLEAU II
ACTIVITES BIOLOGIQUES ET ANTIGENE LIES AU FACTEUR VIII DANS LA MALADIE DE WILLEBRAND ET L'HEMOPHILIE A

	PLASMA NORMAL	PLASMA D'HEMOPHILIE A MAJEURE	PLASMA DE MALADE ATTEINT DE "WILLEBRAND" SEVERE
Activité coagulante	+++	0	±
Activité Willebrand	+++	+++	0
Antigène lié au F VIII	+++	+++	±

C'est à partir de 1971, date à laquelle ZIMMERMAN et al. (18) réussissent à caractériser immunologiquement un antigène lié au facteur VIII et montrent qu'il existe en quantité normale dans le plasma d'hémophile A mais est diminué dans le plasma de sujets atteints de la maladie de Willebrand (tableau II p. 5), que se dessine la notion de l'existence de deux facteurs différents : le facteur VIII et le facteur Willebrand.

La théorie unitaire voulant qu'une seule molécule soit le support des activités attribuées à la fois au facteur VIII et au facteur vWf, a été défendue par plusieurs équipes mais est, à l'heure actuelle, battue en brèche. En effet, il semble maintenant bien établi, en particulier après les travaux de VEHAR et DAVIE (19) sur le plasma de boeuf, que l'activité coagulante attribuée au facteur VIII et l'activité Willebrand sont supportées par deux molécules différentes, néanmoins liées sous forme d'un complexe appelé F VIII/vWf.

Ce sont les propriétés de ce complexe que nous allons préciser dans le chapitre suivant avant d'envisager successivement les connaissances acquises sur le facteur Willebrand et sur le facteur VIII.

LE COMPLEXE FACTEUR VIII/vWF

Le complexe plasmatique appelé F VIII/vWf est, par définition, le support moléculaire des activités biologiques attribuées au facteur VIII et au facteur Willebrand ; nous envisagerons donc tout d'abord le rôle biologique de ce complexe. Nous résumerons ensuite les travaux concernant son isolement puis les données acquises sur ses propriétés biochimiques et immunologiques. La synthèse et les techniques de dosage de ce complexe seront envisagés dans les chapitres suivants consacrés au facteur Willebrand puis au facteur VIII. Pour plus de clarté, nous avons rassemblé dans le tableau III (p 8), la nomenclature définissant les différentes activités biologiques et entités moléculaires, détectées immunologiquement, liées au complexe F VIII/vWf.

TABLEAU III

TERMINOLOGIE CONCERNANT LE FACTEUR VIII ET LE FACTEUR WILLEBRAND

<u>VIII:C</u>	activité coagulante du facteur VIII mesurée par dosage chronométrique (cf p.93).
<u>VIII R:Ag</u>	antigène dit "lié au facteur VIII", en fait lié au facteur Willebrand. Cet antigène est détecté et dosé par diverses techniques immunologiques (cf p.56) grâce à des anticorps hétérologues anti-vWf (cf p.38).
<u>VIII R:RCo</u>	activité cofacteur de la ristocétine, supportée par le facteur Willebrand et nécessaire à l'agrégation de plaquettes humaines en présence de ristocétine (cf p.58).
<u>VIII R:vWf</u>	activité physiologique du facteur Willebrand, assurant l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium, détectée "in vivo" par la mesure du temps de saignement.
<u>VIII:CAg</u>	antigène support de l'activité VIII : C, détecté et dosé par des techniques immunologiques à l'aide d'anticorps homologues anti-VIII (cf p.95).



I RÔLE-BIOLOGIQUE DU F VIII/vWF

L'activité biologique du complexe F VIII/vwf s'exerce à la fois au niveau de la coagulation et de l'hémostase primaire.

A - RÔLE DANS LA COAGULATION - L'ACTIVITÉ VIII : C

L'intervention du F VIII/vwf dans la coagulation se situe dans l'étape de thromboplastinoformation endogène comme nous le précisons ci-dessous, mais elle exige la présence préalable de traces de thrombine qui ont le pouvoir d'"activer" le facteur VIII en le transformant en F VIIIa selon un processus que nous envisagerons dans un second temps.

Contrairement aux autres facteurs de coagulation qui sont des serine-protéases, le facteur VIIIa ainsi que le Va d'ailleurs, agit en temps que cofacteur de réactions enzymatiques. En effet, ainsi que l'indique la fig. 1 (p. 10) le facteur VIIIa se lie au facteur IXa, aux phospholipides et aux ions Ca^{++} (HOUGIE et al. : 20) pour transformer le facteur X en Xa, tout comme le Va, les phospholipides et le Ca^{++} sont des cofacteurs du Xa dans l'activation de la prothrombine en thrombine. Ce rôle de cofacteur du VIIIa, déjà pressenti par BARROW et GRAHAM (21) en analysant les résultats antérieurs, est confirmé par les éléments suivants : le IXa seul active très faiblement le X par une réaction qui, selon certains auteurs, est calcium dépendante (NEAL et CHAVIN: 22), la présence de phospholipides diminue nettement le Km de la réaction (NEAL et CHAVIN : 22, Van DIEIJEN et al. : 23) mais il est net que c'est l'addition de VIIIa qui, d'une part abolit la phase de latence de la réaction (22) et, d'autre part, augmente considérablement sa vitesse (22, 23 et HULTIN et NEMERSON : 24) alors que le VIIIa seul n'a aucune action sur le X (22, 24, OSTERUD et RAPAPORT : 25, SUOMELA et BLOMBACK: 26).

Si pour certains auteurs le traitement préalable du F VIII par la thrombine n'est pas nécessaire pour que le F VIII joue son rôle dans la coagulation (22, 26 et VARADI et HEMKER : 27), l'activation du F VIII par des traces de thrombine (générée soit par la voie exogène de la coagulation, soit par un processus très lent de la voie endogène ayant lieu même en absence de F VIIIa) est une étape essentielle puisqu'

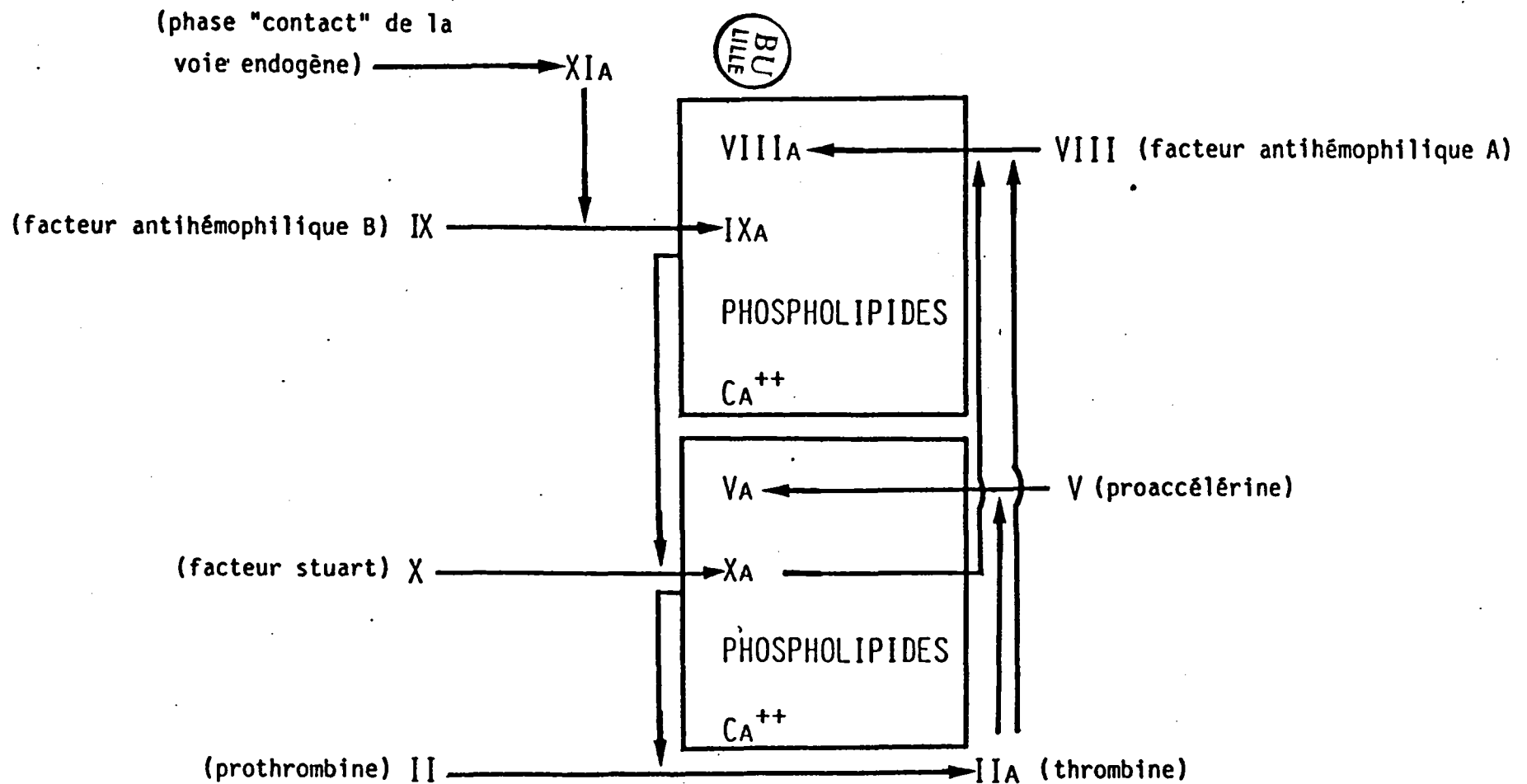
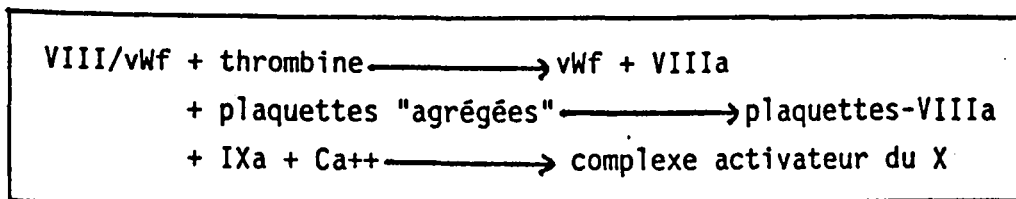


FIGURE 1

SCHEMA MONTRANT L'INTERACTION DU FACTEUR VIII AVEC LES AUTRES FACTEURS DE LA COAGULATION ET SON ANALOGIE AVEC CELLE DU FACTEUR V

elle augmente de 55 (23) à 200 000 (24) fois la vitesse d'activation du facteur X en Xa. ELODI et VARADI (28,29) pensent que la vitesse de formation du complexe IXa-VIII à la surface de la plaquette est influencée par la fixation du F VIII sur celle-ci et que la thrombine induit un changement de conformation du VIII qui permet sa fixation sur la membrane plaquettaire. Cette hypothèse est confirmée par les résultats récents de ANDERSSON et BROWN (30) qui mettent en évidence, par des expériences d'ultracentrifugation, l'action de la thrombine : elle permet de séparer du complexe F VIII/vwf une fraction (VIIIa), de faible masse moléculaire, capable de se fixer ensuite aux vésicules phospholipidiques selon le schéma suivant :



Cette fixation du VIIIa au niveau des phospholipides "libérés" par les plaquettes se traduit par une concentration localisée de substrat (X), de l'enzyme (IXa) et de ses cofacteurs (VIIIa, phospholipides et Ca⁺⁺) et par une protection vis à vis des inhibiteurs de coagulation (VARADI et ELODI : 31) et des protéases granulocytaires (VARADI et ELODI : 32) qui peuvent expliquer l'augmentation de la réaction enzymatique. A l'heure actuelle le site d'action de la thrombine, induisant l'activation du F VIII, sur le F VIII/vwf n'est pas encore élucidé (cf p 82) mais il semble néanmoins être en relation avec un clivage protéolytique (COCKBURN et al. : 33, HOYER et TRABOLD : 34) qui pourrait aboutir à la libération de F VIIIa se dissociant du F vwf.

Des travaux récemment publiés de MERTENS et BERTINA (35) et de HULTIN (36) montrent que l'activation du VIII en VIIIa peut se faire également grâce au facteur Xa. HULTIN (36) précise que ce phénomène de feed-back constaté "in vitro" explique la disparition de la phase de latence de la transformation du X en Xa en présence de VIII non activé et qu'elle se traduit par une amplification de 56 fois du Vmax et une diminution de 6 fois de son Km qui devient alors de 0.14 M, valeur proche de la concentration plasmatique du X.

Si, nous l'avons vu, la plupart des auteurs pensent que le VIIIa, comme le Va, est un cofacteur se distinguant donc de la plupart des autres facteurs de coagulation qui sont des enzymes, ces notions doivent cependant être tempérées par les résultats de VEHR et DAVIE (36') qui montrent que le facteur VIIIa est inhibé par le DFP, un inhibiteur des serine-estérases, et pourrait donc, lui aussi, agir en tant qu'enzyme dans le mécanisme de la coagulation.

B - ROLE DANS L'HEMOSTASE PRIMAIRE

De plus en plus d'éléments permettent de dire que le F VIII/vwf joue un rôle important dans l'hémostase primaire, en tant que médiateur de l'interaction plaquettes/sous-endothélium vasculaire. Il servirait à ancrer le clou hémostatique au niveau de la lésion vasculaire, ce qui est capital dans l'arrêt des hémorragies et explique l'allongement du temps de saignement chez les malades vWD ayant un déficit quantitatif ou qualitatif en F VIII/vwf.

1) Interaction plaquettes/sous-endothélium vasculaire

L'interaction des plaquettes avec le sous-endothélium se traduit par l'adhésion des plaquettes aux microfibrilles, aux membranes basales et au collagène, qui constitue l'étape préalable nécessaire à l'agrégation des plaquettes. Le rôle du F VIII/vwf dans cette interaction a été étudié surtout grâce à la technique de BAUMGARTNER (37) qui a mis au point une chambre de perfusion cylindrique, traversée en son centre par une baguette sur laquelle est retourné en doigt de gant un segment d'artère aortique de lapin dépourvu d'endothélium; on fait circuler le sang à étudier dans l'espace compris entre les parois de la chambre et le sous-endothélium mis à nu. Grâce à ce système TSCHOPP et al. (38) puis WEISS et al. (39) montrent qu'il existe une légère diminution de l'adhésion des plaquettes lorsqu'on analyse du sang de vWD sévères. BARNHART (40) ajoute que cette anomalie quantitative de l'adhésion s'accompagne d'une anomalie qualitative puisque, chez les vWD, il y a formation des pseudopodes anormaux et absence d'étalement des plaquettes. L'anomalie de l'adhésion est accentuée lorsque le sang contient des quantités élevées de citrate (WEISS et al. : 41) ou lorsque la vitesse de passage, donc les forces de cisaillement

du sang, sont augmentées (FUSTER et al. : 42, WEISS ET AL. : 43).

Les preuves directes de l'intervention du F VIII/vwf dans l'adhésion des plaquettes dans ce système expérimental sont les suivantes : BOLHUIS (44) et SAKARIASSEN (45) et al. utilisant des artères rénales humaines, prouvent que le F VIII/vwf est la seule protéine plasmatique impliquée dans l'adhésion. BAUMGARTNER et al. (46), à l'aide d'anticorps anti-VIII/vwf, montrent que, à vitesse lente de passage du sang, l'adhésion des plaquettes n'est pas dépendante du F VIII/vwf alors que si les forces de cisaillement sont augmentées de façon à reproduire les conditions de circulation du sang dans les artères et artérioles, l'adhésion est alors dépendante de la présence et de la concentration en F VIII/vwf plasmatique. Enfin, BOLHUIS et al. (47) distinguent deux étapes dans le mécanisme d'interaction plaquettes/sous-endothélium : dans un premier temps il y a une fixation du F VIII/vwf au sous-endothélium qu'ils évaluent à 6×10^{-4} U de F VIII/vwf/cm², puis ensuite, il y a fixation et étalement des plaquettes sur le sous-endothélium. Se fondant sur une MM de 2.2×10^6 pour le VIII/vwf, BOLHUIS et al. (47) estiment que 250 molécules du F VIII/vwf peuvent se fixer par plaquette et on peut donc imaginer que le F VIII/vwf sert de "colle" entre le sous-endothélium et les plaquettes tout comme la fibronectine sert d'intermédiaire entre la laminine et les fibroblastes (KLEINMAN et al. : 48). Deux phénomènes doivent donc être considérés : d'une part la fixation du F VIII/vwf aux différentes substances constituant le sous-endothélium, d'autre part la fixation du F VIII/vwf aux plaquettes.

2) Fixation du F VIII/vwf au sous-endothélium

Une première série de travaux a été effectuée afin de déterminer si le F VIII/vwf du plasma est capable de se fixer au collagène (NYMAN : 49,50, BAUGH et al. : 51, LEGRAND et al. : 52, SANTORO : 53,54) en étudiant, par exemple, le taux de VIII R:Ag dans les surnageants d'incubation de plasma pauvre en plaquettes additionné de collagène. Il y a en fait une adsorption du VIII R:Ag, notamment sur le collagène de type III mais non sur le type I (CAEN et al. : 55). Cette adsorption du VIII R:Ag ne semble pas se faire par l'intermé-

diaire d'une autre protéine car SCOTT et al. (56) constatent que du F VIII/vWf purifié, marqué à l' ^{125}I , est capable de se fixer, lentement néanmoins, sur du plastique recouvert de différents types (I, III, IV, V) de collagène et SANTORO et COWAN (54) trouvent que le F VIII/vWf purifié se fixe au collagène fibrillaire.

D'après l'hypothèse de CAEN et LEVY-TOLEDANO (55) il existe, à côté du collagène, d'autres substances du sous-endothélium capables de faire adhérer les plaquettes et d'induire indirectement leur agrégation : la membrane basale ou les microfibrilles. Cette dernière possibilité est d'ailleurs confirmée par les résultats de LEGRAND et al. (57) montrant qu'à vitesse de cisaillement élevée, les plaquettes adhèrent aux microfibrilles si on est en présence de F VIII/vWf. Il serait donc intéressant d'étudier les possibilités de fixation du F VIII/vWf sur ces microfibrilles.

3) Fixation du F VIII/vWf aux plaquettes

a) sur des plaquettes "natives"

Jusqu'à récemment il n'existait pas de modèle expérimental qui puisse, sans équivoque, prouver que le F VIII/vWf se fixe aux plaquettes, ou vice versa, bien que cette dernière étape soit un maillon essentiel pour expliquer l'interaction plaquette/sous-endothélium. Des expérimentations ont cependant cherché à mettre en évidence cette fixation en utilisant du F VIII/vWf marqué à l' ^{125}I et des plaquettes lavées, fraîches ou formolées, mais le pourcentage de radioactivité se fixant aux plaquettes est pratiquement nul (KAO et al. : 58) ou très faible : de 4 % à 8 % (MORISATO et GRALNICK : 59 et RUAN et al. : 60).

b) en présence de ristocétine

Cependant, si au système F VIII/vWf purifié et plaquettes on ajoute de la ristocétine, un antibiotique qui agrège les plaquettes d'un plasma riche en plaquettes (PRP) normal mais n'a aucune action sur les plaquettes d'un PRP de vWD sévère (HOWARD et FIRKIN : 61),

il y a alors une fixation importante du ^{125}I - F VIII/vwf (58-60, SCHNEIDER-TRIP et al. : 62, MOAKE et al. : 63) comme l'avaient montré auparavant GREEN et al. (64,65) en utilisant un anticorps fluorescent anti-vwf. Cette fixation que KAO et al. (58) estiment à 31000 molécules de F VIII/vwf par plaquette, à une concentration de ristocétine de 1 mg/ml, a permis à ces auteurs (66) de quantifier par un dosage radiologique le F VIII/vwf plasmatique. Dans certaines conditions, l'interaction F VIII/vwf/plaquettes en présence de ristocétine entraîne une agrégation des plaquettes (HOWARD et FIRKIN : 61) dont la vitesse dépend de la concentration en F VIII/vwf dans le milieu ce qui a permis de mettre au point un dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine (VIII R:RCo) associée au taux de VIII/vwf (SARJI et al. 67) (cf p.59).

En fait, le mécanisme de l'interaction plaquettes/ristocétine/F VIII/vwf n'est pas complètement élucidé malgré de nombreux travaux consacrés à ce sujet (JENKINS et al. : 68, 69, ZUCKER et al. : 70, KIRBY : 71, MOAKE et al. : 72, SUZUKI et al. : 73) puisque certains auteurs pensent que la ristocétine agit d'abord sur le F VIII/vwf (FLOYD et al. : 74) alors que, pour d'autres, la ristocétine se fixe d'abord aux plaquettes et, en modifiant leurs charges, permet l'accessibilité de leurs récepteurs membranaires au F VIII/vwf plasmatique (KOUTTS et al. : 75, MURAKI et al. : 76, COLLIER : 77 et al. : 78). Bien qu'on soit dans des conditions non physiologiques, la fixation du F VIII/vwf aux plaquettes ou l'agrégation de celles-ci en présence de ristocétine, restent des moyens d'approche très intéressants pour étudier l'interaction F VIII/vwf/vaisseau. En effet :

- il existe en général une bonne corrélation entre le dosage "in vitro" de l'activité cofacteur de la ristocétine (VIII R:RCo) du plasma d'un malade et son activité Willebrand estimée par le syndrome hémorragique et le temps de saignement (WEISS et al. : 79).

- KAO et al. (79') ont montré qu'il existe également une bonne corrélation entre le VIII R:RCo et le taux de F VIII/vwf capable de se fixer aux plaquettes en présence de ristocétine.

- DOUCET-DEBRUINE et al. (80) et d'autres (GRALNICK et al. : 81, FURLAN et al. : 82) ont noté que ce sont seulement les formes très polymérisées du F VIII/vwf qui se fixent aux plaquettes en présence de ristocétine, et ces formes sont justement celles qui sont diminuées dans le plasma de vWD de type II (RUGGERI et al. : 83).

- différentes expérimentations (ZUCKER et al. : 83', MOAKE et al. : 84, RUAN et al. : 85) ont prouvé que les plaquettes de malades atteints de dystrophie hémorragique de Bernard-Soulier, caractérisée par un déficit en glycoprotéine membranaire de type GPIb (NURDEN et al. : 86, JENKINS et al. : 87, COOPER et al. : 88), fixent mal le F VIII/vwf en présence de ristocétine alors qu'on sait qu'il existe une anomalie importante de l'adhésion plaquettaire dans ce type d'affection.

- enfin, deux des anticorps monoclonaux anti-VIII/vwf obtenus par MEYER et al. : (89) inhibent à la fois l'interaction plaquettes/sous-endothélium (BAUMGARTNER et al. : 90) et la fixation du F VIII/vwf en présence de ristocétine, sans toutefois inhiber l'agrégation à la ristocétine.

c) sur des plaquettes activées

Récemment LAHAV et HYNES (91) ont montré, par une technique immunoenzymatique, que le F VIII/vwf plasmatique peut se fixer sur des plaquettes préalablement étalées sur une surface plastique. Ce résultat vient d'être confirmé par les travaux de FUJIMOTO et al. (92) qui montrent une liaison spécifique de 125 I-F VIII/vwf sur des plaquettes préalablement stimulées par des traces de thrombine (0,008 à 0,05 U/ml). Cette liaison fait certainement intervenir le métabolisme plaquettaire car elle ne se produit pas sur des plaquettes fixées à la glutaraldehyde, contrairement à la liaison du VIII/vwf en présence de ristocétine, et, de plus, requiert la présence d'ions Ca⁺⁺. Cette liaison du F VIII/vwf aux plaquettes, obtenue grâce à des concentrations de thrombine qui peuvent être générées physiologiquement, serait un élément fondamental pour expliquer l'arrimage électif, au niveau de la brèche vasculaire, du clou plaquettaire et des fibres de fibrine qui vont constituer le caillot définitif.

II PURIFICATION DU F-VIII/vWf

Le facteur VIII/vWf se trouve dans le plasma à un taux faible, de l'ordre de 5 à 10 mg/l. Il s'agit par ailleurs d'un facteur labile, tout au moins si on tient compte de son activité coagulante VIII:C, sensible à la chaleur et aux enzymes protéolytiques. Pour ces raisons sa purification est très délicate et il y a lieu de distinguer :

- la préparation de fractions destinées à un usage thérapeutique pour corriger les anomalies de l'hémostase des hémophiles A et des malades atteints de vWD. Dans ce cas, il est essentiel d'obtenir un rendement correct, de conserver au maximum toutes les activités biologiques du F VIII/vWf, mais la purification complète de celui-ci n'est pas nécessaire.

- la purification poussée du F VIII/vWf dans le but d'étudier ses caractéristiques biochimiques. La question de rendement intervient beaucoup moins mais le degré de purification est essentiel. En outre, il est bien souvent nécessaire de conserver les activités biologiques du complexe moléculaire car elles permettent de détecter et de doser relativement facilement le F VIII/vWf au cours de la purification.

Nous envisageons tout d'abord les principaux principes de préparation des fractions thérapeutiques riches en F VIII/vWf qui sont généralement appliqués lors des premières étapes de purification de ce complexe.

A - PREPARATION DE FRACTIONS THERAPEUTIQUES "ENRICHIES" en F VIII/vWf

Dans le schéma de fractionnement éthanolique à froid du plasma mis au point par COHN et al. (93), c'est la fraction I qui contient la plupart du F VIII/vWf et pratiquement tout le fibrinogène. BLOMBACK et BLOMBACK (94) emploient le glycolle, l'éthanol et des tampons citratés pour éliminer une partie des contaminants du F VIII/vWf de cette fraction et appellent le produit thérapeutique ainsi obtenu fraction I.O. SIMONETTI et al. (95), eux, en éliminant le fibrinogène persistant dans cette fraction I.O., par précipitation à l'acide tannique, obtiennent un produit dénommé FI-0-Ta.

Néanmoins, actuellement, le moyen le plus utilisé pour obtenir une fraction, 5 à 10 fois plus concentrée que le plasma en F VIII/vwf, est la cryoprécipitation. Ce procédé dont l'intérêt a été mis en valeur par les travaux de POOL et SHANNON (96) consiste à décongeler du plasma frais congelé, à une température comprise entre 2 et 4°C ; dans ces conditions une partie des protéines précipite, elle peut être recueillie par centrifugation à froid, mise en solution avec un dixième du volume du plasma de départ de tampon et constitue alors le "cryoprécipité". Dans le surnageant, on retrouve 20 à 40 p.100 du VIII:C et du VIII R:Ag du plasma de départ mais pratiquement plus de VIII R:RCo (OVER et al. : 97). Le cryoprécipité contient des quantités importantes de fibrinogène (8 à 15 g/l) et de fibronectine (2 à 6 g/l), mais aussi beaucoup d'autres protéines plasmatiques et, tout au plus, 0,5 p.100 de F VIII/vwf.

Pour obtenir des fractions plus concentrées en F VIII/vwf, il s'avère nécessaire d'éliminer au préalable au moins une partie des contaminants, en particulier le fibrinogène. Divers procédés sont employés, certains font l'objet de brevets de firmes commerciales préparant des fractions antihémophiliques thérapeutiques, d'autres ont été publiés. Ils sont fondés sur l'emploi du PEG et du glycolle dans la méthode IV de WEBSTER et al. (98), du PEG et de l'éthanol ou du PEG seul dans les protocoles de JOHNSON (99) et NEWMAN (100) et al., ou encore d'une étape de précipitation à froid en milieu de force ionique faible (HERSHGOLD et al. : 100'). Bien que les concentrés ainsi obtenus contiennent au moins 25 U/ml de VIII:C et de VIII R:Ag soit 1 à 3 p.100 de F VIII/vwf purifié environ 70 à 200 fois par rapport au plasma, ils contiennent peu d'activité VIII R:RCo (ALLAIN et al. : 101) et, de façon plus générale, d'activité Willebrand (SMITH et al. : 102, BARROWCLIFFE et al. : 103, Mc CUE et al. : 104, BLATT et al. : 105).

B - ISOLEMENT DE F VIII/vwf HAUTEMENT PURIFIE

Les travaux de RATNOFF et al. (106), PAULSEN et al. (107) et Van MOURIK et MOCHTAR (108) ont démontré que le moyen le plus rapide et le plus efficace de séparer le F VIII/vwf de la plupart de ses contaminants, notamment du fibrinogène, est le tamisage moléculaire. En effet, du fait de sa très grande masse moléculaire (cf p. 20), le F VIII/vwf est exclu de la plupart des gels d'agarose

et se trouve purifié 5000 à 10000 fois, par rapport au plasma de départ, dans la fraction correspondant au volume mort des colonnes de chromatographie.

Cette fraction, qui peut être contaminée par la présence de chylomicrons, peut paraître ne contenir que du F VIII/vWf, lorsqu'elle n'est pas analysée par des techniques immunologiques relativement sensibles. Néanmoins, et ce problème a été discuté dans l'un de nos articles (cf p. 154), elle contient encore de nombreux contaminants puisque, comme l'ont montré de nombreux auteurs (RATNOFF et al. : 109, HERSGOLD et al. : 110, MARCHESI et al. : 111, BENNETT et al. : 112, RICK et HOYER : 113, SHAPIRO et al. : 114), lorsqu'elle est injectée chez un animal, elle induit non seulement des anticorps anti-VIII/vWf mais également des anticorps dirigés contre des contaminants du VIII/vWf = lipoprotéine, fibrinogène, IgM, IgG, fibronectine, albumine...

Afin d'éliminer ces contaminants et de concentrer, dans une étape finale, le F VIII/vWf, diverses techniques sont employées = précipitation à la β -alanine, à la concanavalline A, au sulfate d'ammonium, au PEG... Néanmoins, à notre connaissance, peu de procédés aboutissent à une préparation de F VIII/vWf suffisamment pure pour n'induire que des anticorps monospécifiques hétérologues. Parmi ceux-ci, celui de MADARAS et al. (115) qui effectuent une précipitation à la β -alanine, un tamisage moléculaire et une chromatographie d'affinité sur héparine insolubilisée aboutit à une préparation n'ayant qu'une faible activité coagulante alors que celui que nous avons mis au point (cf p. 184) est fondé, quant à lui, sur l'adsorption des contaminants et ne présente pas cet inconvénient.

III PROPRIETES-BIOCHIMIQUES DU-F-VIII/vWf

On ne possède, à l'heure actuelle, que peu d'éléments concernant la structure du F VIII/vWf. Cette étude nécessite la connaissance de la masse moléculaire de ce complexe et de ses sous-unités. La détermination de la masse moléculaire du F VIII/vWf a fait l'objet de nombreuses études dans les années 65-75. Les résultats obtenus par tamisage moléculaire, ultracentrifugation, "disc-electrophoresis" et microscopie électronique, ont paru décevants, parfois déroutants, mais des travaux récents permettent, maintenant, de les expliquer. Néanmoins, nous verrons ci-dessous que si le problème de la masse moléculaire du F VIII/vWf purifié semble résolu, de nombreuses controverses subsistent en ce qui concerne la masse moléculaire du F VIII/vWf natif.

A - MASSE MOLECULAIRE DU F VIII/vWf PURIFIE

1) Résultats obtenus par tamisage moléculaire

Des gels de porosité croissante ont été utilisés pour estimer la MM du F VIII/vWf d'après son volume d'élution : JOHNSON et al. (116), PAULSSEN et al. (117), RATNOFF et al. (118), CASILLAS et al. (119), Mc KEE (120), HERSHGOLD et al. (121), WEISS et al. (122), SHAPIRO et al. (123) montrent successivement que le F VIII/vWf humain est exclu de G 200, de Sepharose 6B, 4B, 2B et de Biogel A-5 M et A-1.5 M. Les conclusions ne sont guère satisfaisantes puisqu'elles permettent seulement d'estimer que la MM du F VIII/vWf est supérieure à $0,5$ ou $1,5 \times 10^6$ daltons. Cependant, un peu plus tard, HERSHGOLD et al. (124) utilisant un gel d'agarose à 2,5 p.100 arrivent à "retarder" les molécules de F VIII/vWf et évaluent ainsi leur rayon de Stokes à 390 \AA et, à partir d'un coefficient de sédimentation (18 S) et d'un volume spécifique partiel déterminés antérieurement, leur masse moléculaire à $2,8 \times 10^6$ daltons. Cette valeur est revue un peu plus tard par ces mêmes auteurs (125) : sur les bases d'un nouveau coefficient de sédimentation (26.1 S) ils estiment la MM = $4,5 \times 10^6$.

2) Résultats obtenus par ultracentrifugation

a) Ultracentrifugation en gradient de densité

Les études par ultracentrifugation en gradient de saccharose débutent, elles aussi, en 1967 date à laquelle JOHNSON et al. (126) constatent que la constante de sédimentation du F VIII/vWf est supérieure à celle du fibrinogène, HERSHGOLD et al. (127) précisant sa valeur : 18S. D'autres valeurs de S ont été annoncées successivement grâce à cette technique : 40S, 26S, 30S, 26,1S, 21S par RATNOFF et al. (128), HERSHGOLD et al. (129), BENNETT et al. (130), HERSHGOLD (131), MONTGOMERY et ZIMMERMAN (132).

b) Ultracentrifugation analytique

Cette technique n'a été que peu employée et peu de valeurs de constante de sédimentation ont été publiées. La première valeur calculée (16.3S) est celle de HERSHGOLD et al. (129) qui emploient un milieu 6 M en GuHCl pour éviter la formation d'agrégats, la deuxième est celle de LEGAZ et al. (133) : $23,7 \pm 0,5S$ qui concluent, après une ultracentrifugation à l'équilibre, que la masse moléculaire du F VIII/vWf humain est de $1,12 \pm 0,098 \times 10^6$ daltons. Notre étude, elle (cf p.161), est en faveur d'un $S_{20, tp}^{1,5 \text{ mg/ml}} = 20,5$, alors que BOUMA et al. (134) obtiennent une valeur de S_0 de 27 et que BOLHUIS et al. (135) déterminent un $S_{20,w}^0 = 29$, compatible avec une MM de $2,2 \times 10^6$ daltons.

3) Résultats obtenus par "disc-electrophoresis"

Les molécules de F VIII/vWf n'entrent pas dans les gels classiques de polyacrylamide à 7,5, 5 et 3 p.100 (PASQUINI et HERSHGOLD : 136, MARCHESI et al. : 137 et HERSHGOLD et al. : 138) et ceci même si, comme SHAPIRO et al. (139), on ajoute 2 p.100 de SDS et de l'urée ou de la GuHCl 6 M dans les échantillons. Van MOURIK et al. (140) réussissent cependant à faire migrer les molécules de F VIII/vWf, puis à préciser (141) que celles-ci se répartissent en

plusieurs bandes, en utilisant un gel de polyacrylamide à 4,35 p.100 avec un faible degré de réticulation = 0,67 p.100. Cette polydispersité du F VIII/vWf est en accord avec des résultats antérieurs obtenus avec des techniques cependant moins résolutive : tamisage moléculaire (WEISS et al. : 142), chromatographie d'échange d'ions (LUNDBLAD et al. : 143), ultracentrifugation et électrophorèse bidimensionnelle (ZIMMERMAN et al. : 144, SULTAN et al. : 145). D'autres auteurs (COUNTS et al. : 146, GRALNICK et al. : 147, PERRET et al. : 148, MARTIN et al. : 149, BECK et al. : 150, HOYER et al. : 151) ont confirmé l'existence de plusieurs bandes après "disc-electrophoresis" de F VIII/vWf purifié en utilisant des gels différents. COUNTS et al. (146), grâce à un gel d'acrylamide 2 p.100 - agarose 0,5 p.100, précisent que la majorité des bandes se situent dans une zone de migration compatible avec des MM variant entre $3,6$ et $5,6 \times 10^6$ daltons, la bande la plus lointaine du dépôt étant due à une molécule de MM = $1,4 \times 10^6$. Ce résultat est vérifié par GRALNICK et al. (147) qui calculent la répartition des molécules entre les 8 bandes observées : 47 % ont une MM de $4,2$ et $5,6 \times 10^6$, 34 % sont des bandes légères de $1,6$ et $2,8 \times 10^6$, et 19% des molécules très lourdes de $6,8$ à $10,2 \times 10^6$ daltons. La polydispersité du F VIII/vWf est observée également après électrophorèse dans des gels d'agarose à 1 p.100 par BECK et al. (150) et PERRET et al. (148), et dans un gel composé d'agarose et de glyoxyl-agarose par HOYER et SHAINOFF (151) qui concluent que les MM se situent entre $0,85$ et 12×10^6 daltons.

4) Résultats obtenus en microscopie électronique

HERSHGOLD (152) est le premier à observer, dans une préparation de F VIII/vWf ombrée au carbone-platine, des filaments de taille variable. A partir de telles observations, il est possible de calculer approximativement la MM des molécules observées. MARDER et al. (153) après coloration négative distinguent à côté des filaments, des formes rondes de 11 à 33 nm, des formes circulaires de $54,5$ nm et des ellipses de $72,5 \times 34,6$ nm et concluent à une MM voisine de 3×10^6 . TAN et ANDERSEN (154) observent, eux, des baguettes de 22×42 nm (MM égale ou supérieure à $8,5 \times 10^6$) et des formes sphériques de 10 à 50 nm (MM de 1 à 20×10^6). Enfin, plus récemment, BECK et al. (155) distinguent

des filaments formés de structures fibrillaires plus petites pouvant avoir une MM comprise entre $0,6$ et 6×10^6 et des agrégats dont la MM avoisine 10 à 20×10^6 daltons.

B - MASSE MOLECULAIRE DU F VIII/vWf NATIF

Tous les résultats résumés ci-dessus, qui sont en accord avec l'existence de molécules de MM supérieure à $0,5 \times 10^6$ daltons, ont été obtenus grâce à l'application de différentes techniques analytiques à des préparations purifiées de F VIII/vWf humain. Ces formes moléculaires pouvant aller jusque 20×10^6 daltons existent-elles dans le sang circulant ? Certains le pensent et nous verrons sur quels arguments ils se fondent, alors que d'autres semblent prouver que ces formes hautement polymérisées peuvent être des artefacts.

1) Arguments en faveur d'une MM supérieure à $0,5 \times 10^6$ daltons

De nombreux auteurs ont analysé du plasma citraté, sans étape de concentration préalable du F VIII/vWf, par tamisage moléculaire : CASILLAS et al. (156), Mc KEE (157), WEISS et HOYER (158) montrent qu'après chromatographie, l'activité VIII:C et le VIII R:Ag se retrouvent dans les fractions éluées au volume mort de colonnes d'agarose A5M, d'agarose à 4 p.100 et de Biogel 5M. On peut donc supposer que, dans le plasma citraté, le complexe F VIII/vWf a une MM supérieure à $0,5 \times 10^6$ daltons.

L'application de l'ultracentrifugation en gradient de saccharose à du plasma humain citraté a été réalisée tout d'abord par WEISS et KOCHWA (159). Plus récemment, ZIMMERMAN et al. (160) ont ultracentrifugé brièvement du plasma conservé depuis le prélèvement du sang à 37° et calculent la constante de sédimentation du F VIII/vWf: elle serait comprise entre 15 et 18 S et ces auteurs en concluent que les formes de MM élevée du F VIII/vWf purifié existent in vivo. Grâce à l'utilisation d'anticorps hétérologues anti-VIII/vWf marqués à l'¹²⁵I, MEYER et al. (161) et PIETU et al. (162) ont mis en évidence, après "disc-electrophoresis" en gel de porosité suffisante, le F VIII/vWf

isolé en une seule étape à partir du plasma : il se répartit en plusieurs bandes migrant au même niveau que le F VIII/vwf purifié. De plus, RUGGERI et ZIMMERMAN (163) et HOYER et SHAINOFF (164) ont montré qu'il existe la même répartition multimérique du F VIII/vwf dans du plasma frais sans anticoagulant, le plasma citraté ou hépariné et le plasma congelé et conservé plusieurs mois. Enfin PERRET et al. (165) ont précisé, en faisant migrer du plasma dans de l'acrylamide à 2 p.100 sans addition de SDS, que les différentes bandes obtenues étaient à la fois support du VIII:C, VIII R:Ag et VIII R:RCO et qu'elles sont bien dues à la présence de complexes moléculaires F VIII/vwf. Ces différents résultats sont en contradiction avec ceux présentés ci-dessous qui tendent à montrer que la polymérisation du F VIII/vwf est due à un artefact lors de sa purification.

2) Arguments en faveur d'une MM inférieure à $0,5 \times 10^6$ dalton

NEWMAN et al. (166) ont analysé le comportement du VIII:C et du VIII R:RCO lors de l'ultrafiltration de plasma sur XM 100 : si le passage est rapide les deux activités traversent la membrane et sont donc supportées par des molécules de MM inférieure à $0,3 \times 10^6$ alors que si le passage est lent, le F VIII/vwf est retenu et semble avoir une MM supérieure à $0,6 \times 10^6$. SEGHATCHIAN (167), lui, chromatographie le plasma obtenu sans addition d'anticoagulant, incoagulable car préparé à partir de sang prélevé chez un hémophile B avec inhibiteur, et retrouve le VIII:C, le VIII R:Ag et le VIII R:RCO dans les fractions éluées avec des molécules de MM comprise entre $0,2$ et $0,5 \times 10^6$ daltons. Par contre, le fait de congeler préalablement ce même plasma ou de lui ajouter un chélateur du Ca^{++} , par exemple du citrate, provoque un déplacement de toutes ces activités dans les fractions éluées au volume mort de la même colonne. Ces résultats font penser que les résultats antérieurs en faveur d'une MM élevée peuvent être dus à une polymérisation du F VIII/vwf natif lors du prélèvement sur citrate ou lors de la congélation. Enfin, ROCK et al. (168) montrent, par tamisage moléculaire, que les formes légères support de l'activité VIII:C, qu'ils avaient précédemment mises en évidence dans du plasma hépariné, s'agrègent et sont de ce fait exclues des colonnes de chromatographie lorsque le plasma est préalablement additionné de chélateurs de calcium, congelé, ou traité au PEG.

Ainsi le problème de la masse moléculaire du F VIII/vwf se heurte-t-il toujours, à l'heure actuelle, au phénomène de polymérisation de cette molécule. Les MM les plus petites annoncées sont néanmoins de l'ordre de 2×10^5 et le fait qu'on n'ait pas, jusqu'à présent, isolé de cellules humaines de RNA messenger de taille suffisante pour conduire à la synthèse de chaînes peptidiques de plus de mille AA, soit supérieures à 100 000 daltons, laisse à penser que la forme protomérique du F VIII/vwf doit être formée par l'assemblage de plusieurs sous-unités. Plusieurs procédés ont été utilisés pour dissocier le F VIII/vwf en sous-unités : les agents réducteurs sont utilisés afin de réduire les cystine pouvant servir de ponts inter-chaînes, alors que des milieux de force ionique élevée ou faible le sont afin de rompre des liaisons qui seraient, elles, de type non-covalent.

C - SOUS-UNITES OBTENUES EN MILIEU REDUCTEUR

Dès 1970 Mc KEE (169) a mené des expérimentations de "disc-electrophoresis" en acrylamide sur des préparations de F VIII/vwf réduites par le β -mercapto-éthanol ; elles ont montré l'existence de sous-unités, de masse moléculaire bien inférieure à celle du F VIII/vwf non réduit, migrant dans de l'acrylamide à 5 p.100. Dans le tableau IV (p.26) sont reportées les conditions de réduction, les caractéristiques des gels et les estimations de masse moléculaire de différents auteurs. Il apparaît que le F VIII/vwf réduit donne une seule bande ou une bande majeure dont la MM se situe entre $0,195$ et $0,270 \times 10^6$ daltons, résultat en bon accord avec ceux que SHAPIRO et al. (170) et AUSTEN et al. (171) ont obtenu respectivement par ultracentrifugation et tamisage moléculaire. Les discordances de valeur peuvent s'expliquer en partie par le comportement des sous-unités dans des gels de porosités différentes puisque, selon FURLAN et al. (172) la MM semble être de $0,25 \times 10^6$ en acrylamide à 5 p.100 mais de $0,34 \times 10^6$ en acrylamide à 3 p.100 ; de plus, les MM avancées peuvent être un peu sur-estimées car les sous-unités, comme le témoigne leur coloration au bleu de Coomassie et au réactif de Schiff, sont de nature glycoprotéinique. Certains auteurs ont montré la présence d'une ou plusieurs bandes mineures migrant plus loin que la bande de MM voisine de $0,2 \times 10^6$; elles peuvent être dues soit à la présence de contaminants ou de produits de

TABLEAU IV
ESTIMATIONS PAR "DISC-ELECTROPHORESIS" DE LA MASSE MOLECULAIRE DES
SOUS-UNITES DU F VIII/vWF HUMAIN OBTENUES EN MILIEU REDUCTEUR

PUBLICATION	CONDITIONS DE REDUCTION		GEL EMPLOYE		RESULTAT
	Agent,	Concentration	Nature,	Concentration	
Mc KEE (173) 1970	S-Me	0,1 M	Acrylamide	n.p	1 bande majeure = 280 000 + 7 bandes mineures
MARCHESI et al. (174) 1972	DTT	5 a M	Acrylamide	5 p.100	1 bande majeure = 240 000 + 2 bandes entre 80 000 et 160 000
BENNETT et al. (175) 1973	S-Me	1 p.100	Acrylamide	n.p	1 seule bande = 197 000 à 215 000
LEGAZ et al. (176) 1973	S-Me ou DTT	n.p	Acrylamide	5 p.100	1 seule bande = 240 000
SHAPIRO et al. (177) 1973	S-Me 0,1 M S-Me 0,4 M + SDS 2p.100 + 6μMCL S M	n.p	Acrylamide	5 p.100	1 bande majeure = 195 000.
BOUNA et al. (178) 1976	S-Me ou DTT	n.p	Acrylamide	n.p	1 bande = 270 000
FURLAN et al. (179) 1977	S-Me	1 p.100	Acrylamide Acrylamide	3 p.100 5 p.100	1 seule bande = 340 000 1 seule bande = 240 000
OLSON et al. (180) 1977	S-Me	n.p	Acrylamide	5 p.100	1 seule bande = 230 000
COENAN et al. (181) 1978	DTT et alkylation	n.p	Acrylamide	n.p	1 bande majeure = 200 000, 3 bandes mineures entre 120 000 et 180 000, 3 bandes mineures entre 30 000 et 100 000
ATICHARTAKARN et al. (182) 1978	DTT	0,6 p.100	Acrylamide	5 p.100	1 bande = 215 000 + parfois bandes mineures (<5p.100)
VAN HOURIK et al (183) 1978	DTT	1 p.100	Acrylamide	4,35 p.100	1 seule bande
BECK et al. (184) 1978	S-Me	1 p.100	Acrylamide	5 p.100	1 bande = 200 000
COUNTS et al. (185) 1978	S-Me 0,005 à 0,5 p.100 S-Me < 0,1 p.100 0,01 < S-Me < 0,5 p.100 S-Me > 0,5 p.100 S-Me - 5 p.100 DTT 65μM et alkylation	n.p	Acrylamide/ Agarose	2p.100/ 0,5p.100 0,5p.100	1 bande majeure > 200 000 1 bande majeure = 120 000 1a bande de 240 000 apparait 1 bande majeure = 240 000 1 seule bande = 240 000
LANE et al. (186) 1979	S-Me	0,2 p.100	Acrylamide	5 p.100	1 bande majeure entre 182 000 et 230 000 + 7 bandes (30 000, 57 000, 82 000, 85 000, 118 000, 140 000, 160 000)
MARTIN et al. (187) 1980	DTT	n.p	Acrylamide/ Agarose Acrylamide gradient de	2 p.100/ 0,5 p.100 5 à 15 p.100	1 bande majeure = 200 000 1 bande majeure = 208 000 + 3 bandes mineures = 197 000, 174 000, 154 000.
RUGGERI et al. (188) 1980	DTT	0,05 à 0,5 M 5μM			Apparait une bande de 480 000, 1 seule bande de 280 000
GRALNICK et al. (189) 1981	S-Me	0,01 p.100 0,1 p.100			la bande la plus "légère" = 1 500 000 la bande la plus "légère" = 260 000
GIRNA et al. (190) 1982	DTT DTT en présence SDS 10p.100 et d'urée 8 M	65 μM 90 μM	Acrylamide/ Agarose	3,3 p.100/ 1 p.100	1 seule bande = 240 000 la 2ème bande = 240 000

BU
LILLE

dégradation du F VIII/vwf, comme le pensent VAN MOURIK et al. (191), soit à l'hétérogénéité "naturelle" du F VIII/vwf ainsi que le préconisent MARTIN et al. (192). Selon LANE et al. (193), ces bandes mineures, parmi lesquelles se trouvent des sous-unités capables de fixer les anticorps anti-VIII:C homologues, pourraient être dues aux formes réduites du facteur VIII alors que la bande de $0,20 \times 10^6$, qui est retrouvée à partir de F vwf dépourvu de VIII:C, purifié sur DEAE cellulose (OLSON et al. : 194) ou à partir d'hémophile (BENNETT et al. : 195, SHAPIRO et al. : 196), serait dérivée du facteur Willebrand. L'incertitude qui existe encore quant à la MM exacte des sous-unités et de la molécule protomérique du F VIII/vwf explique qu'on ne sache pas précisément de combien de sous-unités est constituée une molécule de F VIII/vwf. Bien que plusieurs auteurs, notamment SHAPIRO et al. (196) et récemment GIRMA et al. (197), aient employé des concentrations élevées d'agent réducteur (β -mercapto-éthanol 0,4 M ou DTT 90 mM) en milieu dissociant (GuHCl 6M ou urée 8M), ils n'ont pas réussi à obtenir de sous-unité de MM inférieure à $0,2 \times 10^6$ daltons. Il semble néanmoins, et cela apparaissait déjà dans l'étude de PEAKE et BLOOM (198), qu'il existe deux types de liaisons S-S reliant ces sous-unités. Les unes sont facilement réduites, en présence de β -mercapto-éthanol 0,01 p.100 (COUNTS et al. : 199), de dithiotreitol (DTT) 0,05 mM à 0,5 mM, ou même de cystéine 0,01 M (FURLAN : 200) alors que d'autres, elles, nécessitent pour être coupées des conditions plus réductrices : β -mercapto-éthanol 0,1 p.100 ou DTT 5 mM. Pour COUNTS et al. (199) le protomère du F VIII/vwf est formé d'un dimère de la sous-unité obtenue en milieu fortement réducteur, alors que pour RUGGERI et ZIMMERMAN (201), le protomère aurait une MM voisine de $0,86 \times 10^6$ et serait formé de 4 sous-unités liées deux à deux par des ponts disulfure stables en milieu peu réducteur, et, entre elles, par des ponts disulfure déjà réduits dans ces conditions. Les résultats de GRALNICK et al. (202) qui montrent que la réduction ménagée par le β -mercapto-éthanol à 0,01 p.100 entraîne une disparition des formes hautement polymérisées de MM = 8,0, 9,1 et $10,2 \times 10^6$ daltons mais pas d'apparition de nouvelle bande de MM inférieure à $1,5 \times 10^6$ daltons alors que le β -mercapto-éthanol à 0,1 p.100 fait apparaître des formes réduites de 0,26, 0,51 et $1,1 \times 10^6$ daltons ne sont cependant pas en accord total avec les deux hypothèses précédentes.

D - SOUS-UNITES OBTENUES EN MILIEU DE FORCE IONIQUE ELEVEE

Alors que, dans les conditions isotoniques, après tamisage moléculaire de plasma on retrouve, au V_0 des colonnes, à la fois l'activité VIII:C et le VIII R:RCo donc le complexe F VIII/vWf, WEISS et al. (203,204) ont montré qu'il en est différemment en milieu de force ionique élevée. En effet, en présence de NaCl 1M, si l'activité VIII R:RCo demeure avec le VIII R:Ag dans la fraction exclue donc de masse moléculaire élevée (fraction HMW : "High Molecular Weight"), l'activité VIII:C, elle, est éluée dans des fractions retardées, au moins autant que le fibrinogène, ce qui correspond à une MM aux environs de $0,2 \times 10^6$ daltons, appelées "LMW". Ces résultats sont vérifiés par tamisage moléculaire en présence de CaCl_2 0,25 M par RICK et HOYER (205) qui, en outre, confirment la présence de deux formes moléculaires de MM différente par des expériences d'ultracentrifugation en gradient de saccharose. COOPER et al. (206) ajoutent qu'il peut y avoir, après dialyse, incubation des HMW et LMW et nouvelle chromatographie, réapparition de l'activité VIII:C au niveau du V_0 . Cet ensemble de résultats permet de penser, qu'en milieu de force ionique élevée, il y a dissociation entre le facteur Willebrand et le facteur VIII et qu'une réassociation est possible.

Cependant cette dissociation est encore sujet à controverse. En effet, Mc KEE et al. (207) et SWITZER et al. (208) ne sont pas parvenus à la reproduire, en NaCl 1M, avec du F VIII/vWf purifié et ont rencontré des difficultés en utilisant du CaCl_2 0,25 M. Ces difficultés pourraient s'expliquer, selon SUSSMAN et al. (209), par le fait que la concentration protéique est un élément déterminant de cette dissociation. Pour Mc KEE et al. (207), il se pourrait que cette apparente dissociation soit due en fait à une dégradation du F VIII/vWf et à la formation de produits de dégradation, encore doués d'activité coagulante, qui seraient adsorbés non spécifiquement sur les gels. BECK et al. (210) qui rapportent que la dissociation est évitée par addition de Trasylol*, un agent anti-fibrinolytique, semblent confirmer cette hypothèse, néanmoins SUSSMAN et al. (211,212) et POON et RATNOFF (213) obtiennent une dissociation du VIII:C et du VIII R:Ag à partir de F VIII/vWf humain toujours maintenu en présence

d'un mélange d'inhibiteurs de protéases de spectre large.

Pour résumer, il semble que la majorité des travaux tendent à prouver que le facteur VIII, de relative faible masse moléculaire, est associé au facteur Willebrand, de MM importante et de structure multimérique (FASS et al. : 214), par un mécanisme faisant intervenir des forces électrostatiques pouvant se rompre soit en milieu de force ionique élevée (cf ci-dessus), soit en milieu de force ionique faible (Van MOURIK et al. : 215) ou encore lors de chromatographie d'échange d'ions (BAUGH et al. : 216).

E - AUTRES PROPRIETES PHYSICOCHEMIQUES DU F VIII/vwf

Alors que de nombreux travaux ont été consacrés à la détermination de la MM du F VIII/vwf, ses autres propriétés physicochimiques ont été peu étudiées. La plupart des éléments apportés ci-dessous sont déroutants. Les discordances peuvent s'expliquer en partie par le fait que ces résultats datent d'une époque où les préparations étaient plus ou moins purifiées, et avant qu'on ne connaisse l'existence d'un complexe F VIII/vwf et ses conditions de dissociation ; elles ont néanmoins le mérite de montrer la complexité des problèmes que présente ce genre d'étude appliquée au F VIII/vwf.

1) Mobilité électrophorétique

Le tableau V (p.30) montre les conclusions d'études électrophorétiques effectuées sur différents supports et en détectant le complexe F VIII/vwf par son activité VIII:C. Les discordances peuvent s'expliquer du fait de l'interférence possible de chylomicrons qui empêchent la migration du F VIII (PAULSSEN : 217), ou de la dissociation possible entre le F VIII et le F vwf dans certains tampons de migration.

2) Absorption en lumière ultra-violette

En 1966, VEDER (218) montre qu'une préparation de F VIII/vwf humain purifié n'a pas de pic d'absorption à 280 nm, néanmoins, en urée, la densité optique augmente à cette longueur d'onde (VEDER : 219). JOHNSON et al. (220), HERSHGOLD et al. (221) confirment qu'il n'y a pas de maximum

d'absorption à 280 nm mais une dispersion ("scattering") de la lumière entre 300 et 400 nm qui diminue d'ailleurs lorsque les préparations de F VIII/vwf sont délipidées (HERSHGOLD : 221). A l'heure actuelle, connaissant la faible concentration plasmatique de ce complexe et la difficulté de l'obtenir parfaitement pur, on peut mettre en doute ces résultats obtenus certainement sur des préparations trop diluées et contaminées.

TABLEAU V
MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DU F VIII/vwf HUMAIN

AUTEURS	SUPPORT	ZONE DE MIGRATION
BARKHAN <u>et al.</u> (222)	amidon de pomme de terre	$\alpha 2$ une partie jusque $\alpha 1$
BI LI BIDWELL <u>et al.</u> (223)	en veine liquide	entre Alb et $\alpha 1$ + une partie en $\alpha 2$
HERSHGOLD <u>et SPRAWLS</u> (224)	non précisé	entre $\alpha 2$ et $\beta 1$
MEYER <u>et al.</u> (225)	acétate de cellulose	$\alpha 2$ ou entre $\alpha 2$ et β
HERSHGOLD <u>et al.</u> (226)	acétate agarose 0,7 p.100	origine entre $\alpha 2$ et β
PAULSSEN <u>et al.</u> (227)	sur papier et acétate	γ

F - COMPOSITION CHIMIQUE DU F VIII/vwf

1) Copule protéique

Bien que la faible absorption à 280 nm du F VIII/vwf ait amené BARROW et GRAHAM (228) à douter de sa nature protéique, il est maintenant admis que ce complexe est formé en partie de protéines. Nous avons reporté dans le tableau VI (p. 32) les différentes compositions en acides aminés publiées. Les valeurs obtenues par les différents auteurs, recalculées pour être exprimées en nombre de résidus par mg de protéine, afin de ne pas faire intervenir la MM de la sous-unité, seront données à titre comparatif dans le chapitre "résultats personnels" (p. 196). Plusieurs auteurs soulignent la faible proportion de résidus Méthionine, Tyrosine, Tryptophane (SHAPIRO et al. : 229, LEGAZ et al. : 230), et l'absence de groupements SH libres (HERSHGOLD et al. : 231, MARCHESI et al. : 232, LEGAZ et al. : 230). HOLMBERG et al. (233) ont étudié les fragments obtenus par coupure trypsique ou au BrCN. NACHMAN et al. (234) ont établi les cartes peptidiques de fragments trypsiques marqués à 1^{125} I.

2) Copule glycanique

L'existence d'une copule glycanique dans la molécule de F VIII/vwf est présumée dès 1967-69 grâce aux travaux de HERSHGOLD et al. (235) et KASS et al. (236) qui montrent respectivement que cette molécule se colore au réactif à l'acide périodique de Schiff (PAS) et réagit avec la Concanavaline A. La nature glycoprotéinique du F VIII/vwf est désormais indiscutable mais les études précises de la composition glycanique du F VIII/vwf humain sont rares. Nous avons résumé dans le tableau VII et VIII (p. 33 et 34) les résultats publiés, ils proviennent essentiellement des équipes de GRALNICK et de Mc KEE. Nous comparerons ultérieurement leurs résultats à ceux que nous avons établis durant la même période (p. 208, 209).

3) Copule lipidique

HERSHGOLD et al. (237) sont les premiers à mettre en évidence des lipides dans des préparations de F VIII/vwf. Ils estiment à 11 p.100 leur proportion dans cette molécule (avec 76 p.100 d'acides aminés et 11 p.100 de monosaccharides), la moitié

TABLEAU VI

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DU F VIII/vWF HUMAIN

PUBLICATIONS	HERSGOLD et al. 1971 (231)	MARCHESI et al. 1972 (232)	SHAPIRO et al. 1973 (229)	LEGAZ et al. 1973 (230)	HOLMBERG et al. 1975 (233)	CASILLAS et al. 1976 (238)
Mode d'expression des résultats	mmoles/mg protéine	mmoles/mg protéine	nombre de résidus par sous-unité de MM = 195 000	nombre de résidus pour 100 000g de protéine	nombre de résidus pour 180 000g de protéine	nombre de résidus pour 100 000g de protéine
Lys	0,508	0,437	95,94	39,9	88,8	44,3
His	0,173	-	53,04	22,5	40,1	20,2
Arg	0,436	0,358	94,38	39,9	70,7	47,1
Asp	0,791	1,03	162,63	85,4	137,9	69,8
Thr	0,508	0,461	99,65	60,1	89,1	47,4
Ser	0,630	0,700	129,87	70,8	157,9	84,5
Glu	1,032	0,946	224,06	89,9	204,5	113,0
Pro	0,521	0,644	117,00	61,2	96,2	66,0
Gly	0,660	0,772	131,63	62,9	156,5	78,0
Ala	0,543	0,506	96,92	43,8	95,7	49,5
½ Cys	0,235	-	120,71	65,7	109,5	57,7
Val	0,596	0,639	151,71	75,8	126,1	68,7
Met	0,099	0,087	24,77	8,4	22,9	25,1
Ile	0,317	0,345	62,21	33,7	56,1	31,7
Leu	0,684	0,488	134,36	65,2	113,2	72,2
Tyr	0,230	0,193	34,71	20,2	32,3	22,5
Phe	0,265	0,253	49,34	27,0	43,2	24,6
Trp	-	-	-	24,7	29,5	-

BU
LILLE

COMPOSITION CENTESIMALE DES MONOSACCHARIDES DU F VIII/vwf

	MONOSACCHARIDES TOTAUX	OSAMINES	ACIDE SIALIQUE	MONOSACCHARIDES NEUTRES
Mc KEE 1970 (239)				5 p.100
HERSGOLD <u>et al.</u> 1971 (240)	11 p.100			
MARCHESI <u>et al.</u> 1972 (241)		GlcNAc = 2,7 p.100 GalNAc = 0,17 p.100		
LEGAZ <u>et al.</u> 1973 (242)	(= 6 p.100)	2,7 p.100	0,9 à 1,2 p.100	2,2 p.100
PAULSSEN <u>et al.</u> 1974 (243)	30 à 40 p.100 20 à 30 p.100	4 à 6 p.100 3 à 5 p.100	1 à 2 p.100 0 à 1 p.100	Fuc = 1 à 3 p.100 1 à 2 p.100
GRALNICK <u>et al.</u> 1977 (244)			≈ 1,5 p.100	
SODETZ <u>et al.</u> 1977 (245)			≈ 5 p.100	
GRALNICK 1978 (246)			≈ 3,3 p.100	
SODETZ <u>et al.</u> 1979 (247)	15 p.100	GlcNAc = 4 p.100 GalNAc = 0,7 p.100	3,7 p.100	Man = 3,2 p.100 Gal = 2,4 p.100 Fuc = 1,0 p.100
ROSENFELD <u>et</u> KIRBY 1979 (248)			4 p.100	



TABLEAU VIII
COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES, EXPRIMEE EN NANOMOLES PAR MG DE PROTEINE, DU F VIII/vwf

	OSAMINES * : hydrolyse acide + : N Ac glucosaminidase	ACIDE SIALIQUE * : hydrolyse acide + : neuraminidase	OSES, NEUTRES * : hydrolyse acide - oxydés par la galactose-oxi- dase avant (°) et après (°°) désialylation - libérés par la β-galactosi- dase, avant (+) et après(++) désialylation
GRALNICK <u>et al.</u> 1977 (244)		38,3 ± 7,9nM*	
SODETZ <u>et al.</u> 1977 (245)		154 ± 15nM* 160 ± 15nM+	
GRALNICK 1978 (246)		107,9 ± 8,7nM* 112,6 ± 10,3nM+	
SODETZ <u>et al.</u> 1978 (249)		120 ± 12nM* 114nM+	Gal* = 135 ± 13nM Gal++ = 84nM
SODETZ <u>et al.</u> 1979 (250)	GlcNAc = 181 ± 18nM* GalNAc = 33 ± 4nM *	120 ± 12nM	Gal* = 135 ± 13nM Man = 175 ± 25nM Fuc = 59 ± 6nM
KAO <u>et al.</u> 1980 (251)		115,4 ± 1,4nM *	Gal* = 165,3 ± 14,8nM
MORISATO et GRALNICK 1980 (252)		109,6 ± 9,0nM	{ Gal° = 73,2 ± 6,1nM Gal°° = 173 ± 10,4 nM Gal += 0 Gal+++ = 111 ± 9,2nM
DE MARCO et SHAPIRO 1981 (253)		131 ± 16nM*	
GRALNICK <u>et al.</u> 1982 (254)	GlcNAc = 163 ± 30nM+	145 ± 14nM*	{ Gal* = 165 ± 18nM Gal+++ = 143 ± 12nM Fuc = 54nM
GRALNICK <u>et al.</u> 1982 (255)	GlcNAc = 151nM+	152 à 163nM+ 165nM*	Gal+++ = 152nM+

d'entre eux étant constituée de phospholipides, l'autre de lipides neutres. Ces auteurs pensent que ces lipides font partie intégrante de la molécule de F VIII/vwf car ils ont montré (HERSHGOLD et al.; 256) que la phospholipase D active le VIII:C alors que cette activité est détruite par la phospholipase C. D'autres auteurs (GREEN : 257, MARCHESI et al. : 257'), au contraire, pensent que le F VIII/vwf humain ne renferme pas de lipides et pensent (257') que le peu de lipides (< 5 p.100) présent dans les préparations est dû à la présence de contaminant, en particulier de chylomicrons. PAULSSEN et al., un peu plus tard, ont d'ailleurs démontré la possibilité d'association entre le F VIII/vwf et des chylomicrons (258').

IV- IMMUNOLOGIE DU F VIII/vWf

Les méthodes immunologiques ont beaucoup apporté à l'étude du complexe F VIII/vWf. Contrairement aux techniques fondées sur des tests de coagulation, elles sont capables de détecter les molécules même non fonctionnelles et ceci est particulièrement intéressant pour analyser le facteur VIII qui est un facteur labile. D'autre part, elles ont l'avantage, sur les techniques biochimiques, de ne nécessiter que de petites quantités de produit.

Deux types d'anticorps ont été utilisés pour étudier le F VIII/vWf. Dans le tableau IX (p. 37), nous avons résumé leurs propriétés.

Les anticorps hétérologues, développés par des animaux immunisés avec des préparations de F VIII/vWf humain purifié sont, si ils sont polyclonaux, essentiellement dirigés, contre le F vWf et présentent parfois, une activité anti-VIII:C. Les anticorps obtenus par la technique des hybridomes sont eux électivement dirigés contre des épitopes du F VIII/vWf situés soit sur le F vWf, soit sur le F VIII.

Les anticorps homologues, c'est-à-dire apparus chez l'homme soit spontanément (auto-anticorps) soit, plus souvent, au cours d'un processus d'immunisation (allo-anticorps) déclenché chez l'hémophile ou le sujet vWD par des injections répétées de fractions thérapeutiques enrichies en F VIII/vWf, peuvent, eux, être classés en 2 catégories: Les allo-anticorps de l'hémophile et les auto-anticorps sont essentiellement dirigés contre le F VIII, ils sont appelés anticoagulants anti-VIII:C. Les allo-anticorps du vWD sévère et les auto-anticorps de certains sujets ayant développé une maladie de Willebrand dite "acquise" sont, eux, dirigés contre le F vWf.

Nous n'envisagerons donc ci-dessous que les anticorps hétérologues et traiterons dans les chapitres suivants, consacrés au F vWf et au F VIII, le cas des anticorps homologues essentiellement anti-F vWf (p.54) ou anti-F VIII (p.84).

TABLEAU IX

PRINCIPALES PROPRIETES DES DIFFERENTS ANTICORPS LIES AU F VIII/vWf

FVIII/vWf

ANTICORPS HETEROLOGUES

polyclonaux

certains ont une activité anti-VIII:C
souvent faible et variable ,
d'autres n'inhibent pas le VIII:C

tous précipitent le F vWf; anti-VIII R:
Ag; ils ont une activité
anti-VIII R:RCo, ils inhibent générale-
ment l'adhésion des plaquettes aux bil-
les de verre et l'interaction plaquet-
tes/sous-endothélium = anti-VIII R:vWf

monoclonaux

certains inhibent spécifiquement
l'activité coagulante = anti-VIII:C

d'autres inhibent l'agrégation à la
ristocétine = anti-VIII R:RCo, en
précipitant parfois le F vWf = anti-
VIII R:Ag .

ANTICORPS HOMOLOGUES



alloanticorps

développés par les patients vWD homozygotes

certains ont une activité anti-VIII:C,
souvent faible

tous inhibent l'agrégation à la risto-
cétine = anti-VIII R:RCo, certains
précipitent le F vWf = anti-VIII R:Ag

développés par les hémophiles A

tous inhibent le F VIII coagulant =
anti-VIII:C; ils se lient plus ou moins
au F VIII, (quelques uns précipitent en
présence de F VIII): anti-VIII:CAg

certains auraient une activité anti-
vWf

autoanticorps

développés par des personnes n'ayant aucune maladie hémorragique congénitale

certain inhibent essentiellement le
VIII coagulant (anti-VIII:C) ils indui-
sent une "hémophilie A acquise"

d'autres agissent essentiellement sur
le F vWf (anti-VIII R:vWf) , ils cons-
tituent l'une des causes de la "mala-
die de Willebrand acquise"

A - OBTENTION DES ANTICORPS HETEROLOGUES

La première immunisation de lapin avec du F VIII/vWf semi-purifié est rapportée, en 1957, par SHANBERGE et GORE (258). L'antisérum qu'ils obtiennent empêche la coagulation d'un sang normal et cet effet anticoagulant (anti-VIII:C) peut être inhibé non seulement par un plasma normal, mais également par un plasma d'hémophile A. Ces résultats qui impliquent que le plasma d'hémophile A contient une molécule qui, comme celle du plasma normal, neutralise l'antisérum, font penser à l'époque que l'antisérum de SHANBERGE et GORE n'est en réalité pas dirigé contre le facteur VIII puisque le dogme, alors en vigueur, est que c'est justement l'absence de facteur VIII qui caractérise l'hémophilie A.

En fait, une quinzaine d'années plus tard, ZIMMERMAN et al. (259), publient le protocole de préparation d'un antisérum hétérologue préparé chez le lapin immunisé avec une préparation dite hautement purifiée ; cet antisérum neutralise l'activité coagulante du VIII et précipite pour ne donner, lorsqu'il est convenablement absorbé, qu'un seul arc en présence de plasma normal ou d'hémophile A alors qu'il ne réagit pas en présence de plasma de vWD sévère.

A partir de 1971, s'inspirant des travaux de ZIMMERMAN et al. (259), dans de nombreux laboratoires on s'attache à préparer son propre antisérum, mais les divers antisérums obtenus doivent être, eux aussi, épuisés pour ne donner qu'un seul arc contre le plasma normal. Des techniques de chromatographie d'affinité décrites plus récemment (MADARAS et al. : 260), permettent néanmoins d'obtenir des préparations de F VIII/vWf suffisamment pures pour n'induire chez le lapin, que des anticorps dirigés contre le F VIII/vWf.

Enfin, au cours de ces dernières années, plusieurs équipes appliquent, afin de préparer des anticorps monoclonaux, la technique des hybridomes à partir de lymphocytes isolés des rates de souris Balb/c hyper-immunisées avec du F VIII/vWf. Les premiers résultats sont publiés par MEYER et al. (261) et SOLA et al. (262).

B - PROPRIETES DES ANTICORPS HETEROLOGUES

1) anticorps monoclonaux

Les divers anticorps monoclonaux qui ont en commun le pouvoir de se fixer au F VIII/vWf sont dirigés contre un seul de ses déterminants antigéniques ; de ce fait, ils inhibent spécifiquement l'activité biologique supportée par la fraction moléculaire où se situe ce déterminant. C'est ainsi que certains d'entre eux inhibent partiellement l'agrégation à la ristocétine et précipitent parfois en présence de VIII R:Ag (GOODVALL et al. : 263), alors que d'autres neutralisent l'activité coagulante VIII:C (SOLA et al. : 262).

2) anticorps polyclonaux

Les antisérums hétérologues obtenus par technique d'immunisation classique avec du F VIII/vWf contiennent, eux, des anticorps polyclonaux dirigés contre plusieurs fractions antigéniques du complexe moléculaire F VIII/vWf et, en particulier, à la fois contre celle qui supporte l'activité coagulante VIII:C et celle responsable de l'activité VIII R:vWf. Néanmoins, comme ces antisérums sont obtenus avec des préparations de F VIII/vWf plus ou moins purifiées, plus ou moins dénaturées, avec des protocoles d'immunisation variable, chez différentes races ou espèces d'animaux et qu'ils sont, de plus, épuisés avec des matériels divers (surnageant de cryoprécipité, plasma du vWD sévère) ils n'inter-agissent pas tous de la même façon avec les nombreux sites antigéniques du F VIII/vWf.

a) anticorps contre le F VIII

L'activité anticoagulante anti-VIII:C des antisérums hétérologues, est rapportée pour la première fois en 1957 (SHANBERGE et GORE : 264). Cette activité neutralisante obtenue après immunisation avec du F VIII/vWf est variable et son mécanisme, si on sait qu'il se traduit par une diminution ou même une disparition de l'activité coagulante VIII:C, n'est pas encore élucidé.

α.Variabilité :

La variabilité de l'activité neutralisante d'un antisérum, qui s'exprime par son titre d'activité anticoagulante, est très grande puisque certains antisérums, tels ceux obtenus par JOSHUA et al. (265) chez la souris, ont des titres élevés comparables à ceux développés par certains hémophiles A dits "hauts répondeurs" (p.84), alors que d'autres, tels ceux de SHEARN et al. (266), GUDE et al. (267) et HOUGIE et al. (268), ne sont pas neutralisants. Néanmoins, il faut noter que ces derniers auteurs obtiennent une activité neutralisante en concentrant leur antisérum.

L'origine de cette variabilité est multiple :

- L'animal immunisé : l'espèce à laquelle appartient cet animal entre en ligne de compte puisque JOSHUA et al. (265) montrent que la souris Balb/c donne un antisérum 100 fois plus puissant que celui obtenu chez le lapin immunisé avec la même préparation. D'un animal à l'autre la réponse diffère également puisque 6 souris de la même souche, immunisées avec la même préparation, donnent des sérums de titre variant de 35 à 185 (265) et que BOBROW et al. (269) obtiennent, chez la souris C57BL/6J, un antisérum essentiellement dirigé contre le VIII R:Ag et n'ayant qu'une activité anti-VIII:C de 1 à 2 unités Bethesda.

- Le protocole d'immunisation : ainsi BOUMA et al. (270) remarquent que les prélèvements de lapins immunisés depuis peu sont peu ou pas inhibiteurs du VIII:C et que les anticorps anti-VIII:C apparaissent plus tardivement au cours de l'immunisation.

- La préparation injectée : KERNOFF et RIZZA (271) font la relation entre l'existence de VIII "détectable par les tests de coagulation" (VIII:C), dans la préparation immunisante et l'apparition d'anticorps, non précipitant mais neutralisant, dans le sérum du lapin utilisé. En particulier, l'injection de cryoprécipité provenant de plasma d'hémophiles A majeur n'induit pas la remontée du titre d'anticorps neutralisant anti-VIII:C chez un lapin précédemment immunisé avec du cryoprécipité normal.

B. Spécificité :

Pour déterminer vers quelle fraction de la molécule du F VIII/vWf est dirigé ce type d'anticorps hétérologues, on a étudié l'effet, sur leur activité anticoagulante, de leur incubation préalable avec des plasmas normaux et de malades. Comme on peut s'y attendre, les plasmas normaux doués d'activité VIII:C inhibent l'activité anticoagulante de ces antisérums mais de plus, plusieurs auteurs constatent que le plasma de la majorité des hémophiles A, comme le plasma normal, a la capacité de neutraliser l'effet anticoagulant des anticorps de lapin (SHANBERGE et GORE : 272, PIPER et SCHREIER : 273, BERGLUND : 274, BENNETT et HUEHNS : 275, ZIMMERMAN et al. : 276). Ceci semble montrer qu'il existe, dans le plasma de la majorité des hémophiles A, une molécule présentant des sites antigéniques liés au VIII:C mais dépourvue d'activité coagulante. Néanmoins, comme le montrent BIGGS et al. (277), ces résultats (qui sont en contradiction avec ceux de KERNOFF et RIZZA (271) montrant qu'aucun des plasmas des 5 hémophiles A étudiés ne possède de site antigénique capable d'induire la stimulation de la synthèse d'anticorps neutralisants le VIII:C par un lapin) doivent être interprétés avec prudence car la cinétique d'action de ces antisérums hétérologues est complexe du fait qu'ils sont constitués d'un mélange d'anticorps anti-VIII:C et anti-VIII R:Ag.

b) anticorps dirigés contre le F vWf

α. Spécificité :

L'animal immunisé avec le complexe F VIII/vWf réagit souvent facilement contre le F vWf, ce qui est facilement concevable puisque celui-ci représente plus de 99 p.100 du complexe F VIII/vWf. Plusieurs publications déjà anciennes (BERGLUND : 278, VAINER et CAEN : 279, USZYNSKI : 280), font état de l'obtention d'anticorps hétérologues précipitants obtenus après immunisation avec de la fraction I-0 de COHN en particulier. Parmi celles-ci, celle de USZYNSKI (280) qui rapporte la présence d'un arc de précipitation, sous le puits de dépôt en immunoelectrophorèse, lorsqu'il analyse des plasmas normaux et 50 plasmas d'hémophiles A, arc par ailleurs très faible pour 6/8

plasmas de vWD, est très intéressante car elle évoque déjà, dans sa discussion, la coexistence de deux types d'anticorps dans les antisérums hétérologues : l'un, précipitant, dirigé contre une "sous-unité" de la globuline antihémophilique (AHG) absente dans la maladie de Willebrand mais normale dans l'hémophilie et l'autre, détecté par les tests de coagulation, non précipitant, dirigé contre l'autre "sous-unité" anormale, elle, dans l'hémophilie A. En 1971, ZIMMERMAN, RATNOFF et POWELL (281) mettent en évidence des anticorps neutralisants et précipitants dans le sérum de lapins immunisés avec une préparation qui, selon eux, est du facteur VIII hautement purifié mais qui contient, en fait, le complexe F VIII/vWf. Ces anticorps précipitent avec un antigène, présent au même taux dans les précipités éthanoliques de plasmas normaux ou de 22 hémophiles A, mais diminué dans les précipités préparés à partir du plasma de 11 malades vWD. Ces auteurs concluent que la maladie de Willebrand est caractérisée par un déficit vrai en facteur VIII alors que, dans l'hémophilie, il y a synthèse d'une forme non fonctionnelle de ce facteur qu'ils appellent "AHF-like material". Peu après, à partir d'antisérums similaires, c'est à dire contenant des anticorps précipitant le "AHF" et neutralisant son activité coagulante, MUNTZ et al. (282) et SHEARN et al. (283) font la preuve que les anticorps précipitant ne sont pas dirigés contre le VIII:C car ils sont absorbés spécifiquement avec du plasma d'hémophile A majeur (282) ou avec la fraction de masse moléculaire élevée, HMW, dissociée du complexe F VIII/vWf (283), sans que l'activité neutralisante de l'antisérum ne soit diminuée.

En fait, maintenant que la théorie bimoléculaire du F VIII/vWf est établie, on peut dire que ces anticorps dirigés contre l'antigène "AHF-like" appelé par la suite "factor VIII-related antigen" ou F VIII R:Ag, sont en fait spécifiques du support moléculaire, antigénique, du F vWf comme le pensaient déjà HOLMBERG et NILSSON en 1972 (284).

B. Propriétés :

Les anticorps hétérologues sont précipitants ; ce caractère permet de détecter et de doser le VIII R:Ag par différentes techniques immunologiques (voir p. 56). L'action des anticorps se traduit également par une activité anti-VIII R:vWf c'est à dire par

l'inhibition de certaines propriétés du F vwf : ces anticorps inhibent l'adhésion des plaquettes aux billes de verre (BOUMA et al. : 285), l'agrégation d'un PRP normal en présence de ristocétine (MEYER et al. : 286) sauf s'ils ont été préalablement absorbés avec du cryoprécipité d'hémophile A (MEYER et al. : 287), et l'interaction plaquettes/sous-endothélium lors du passage du sang à des vitesses de cisaillement élevées, soit supérieures à 500 s^{-1} (BAUMGARTNER et al. : 288), en diminuant à la fois l'adhésion des plaquettes et l'agrégation induite par celle-ci.

LE FACTEUR WILLEBRAND

Le terme facteur Willebrand (F vwf) s'adresse à la partie du complexe moléculaire F VIII/vwf qui est le support :

- de l'ensemble des activités biologiques intervenant au niveau de l'hémostase primaire (p.12 à 16),
- de l'activité cofacteur de la ristocétine,
- des sites antigéniques reconnus par les anticorps hétérologues précipitants anti-F VIII/vwf (p.38).

Ces différentes activités appelées respectivement VIII R:vwf, VIII R:RCo et VIII R:Ag sont, malgré leur abréviation équivoque, supportées par une molécule distincte du facteur VIII, car dépourvue d'activité coagulante (VIII:C) et non reconnue par les anticorps homologues anti-VIII C:Ag (p.41 à 43).

Nous envisagerons successivement la synthèse, l'isolement, les propriétés biochimiques, et les techniques de dosage propres à ce facteur Willebrand avant d'aborder le problème des relations existant entre sa structure et son activité biologique.

I - SYNTHÈSE - DU - F - vWF

La synthèse du F vwf qui est sous le contrôle d'un autosome, puisque la forme sévère de la maladie de vWD, se caractérisant par un déficit de F vwf, se rencontre dans les deux sexes, peut se faire au niveau des cellules endothéliales et des mégacaryocytes (NACHMAN et al. : 289). Cependant, comme SULTAN et al. (290) ont montré qu'il ne semble pas y avoir d'échange entre le F vwf intra-plaquettaire et le F vwf plasmatique et que c'est seulement à ce dernier que se limite notre exposé, nous n'envisagerons que la synthèse par les cellules endothéliales.

A - LOCALISATION TISSULAIRE DU VIII R:Ag

Les techniques d'immunofluorescence avec des anticorps anti-VIII R:Ag ont permis, dès 1973, à BLOOM et al. (291) et HOYER et al. (292) de détecter le F vwf au niveau des cellules endothéliales de tous les artères, artérioles, capillaires et veines ; les seules autres cellules marquées étant les plaquettes et les mégacaryocytes. Le marquage des cellules endothéliales est déjà visible sur l'endothélium vasculaire d'un fœtus de 8 semaines (TUDDENHAM et al. : 293), ce qui prouve que la synthèse du F vwf se fait précocément au cours de l'embryogénèse. HOLMBERG et al. (294) et POTTER et al. (295) ont montré l'absence de VIII R:Ag au niveau des cellules endothéliales de malades ayant une forme sévère de vWD. La localisation du VIII R:Ag a été également confirmée grâce à des anticorps couplés à la ferritine (PIOVELLA et al. : 296) ou à la peroxydase (MUKAI et al. : 297) et précisée par microscopie électronique (RAND et al. : 298).

Néanmoins, ces résultats ne suffisent pas pour conclure que le F vwf est synthétisé par les cellules endothéliales, ce facteur pouvant être synthétisé par d'autres cellules puis stocké ou adsorbé au niveau de l'endothélium, d'autant plus que WALL et al. : (299) et JONES et al. : (300) ont montré que le F VIII/vwf est capable de s'adsorber à la surface des cellules endothéliales.

B - SYNTHÈSE DU F vWF PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES EN CULTURE

C'est grâce à des cultures de cellules endothéliales provenant de veine de cordon ombilical que JAFFE et al. ont prouvé que ces cellules synthétisent le F vwf. Ces auteurs montrent tout d'abord

que les milieux de culture renferment du VIII R:Ag, et que l'addition d'acides aminés radioactifs aux cultures est suivie de la présence de radioactivité au niveau des immuncomplexes formés par un anti-sérum anti-F VIII/vWf et ce milieu (301) ; ils ajoutent plus tard que le VIII R:Ag des surnageants de culture a une activité VIII R:RCo (302) et est composé, tout comme le F vWf plasmatique, de sous-unités de MM = 200 000 (303). JAFFE (304) et SHEARN et al. (305) qui précisent que le VIII R:Ag excrété par les cellules endothéliales a une mobilité électrophorétique augmentée par rapport au VIII R:Ag plasmatique, ne trouvent, par contre, aucune activité VIII:C dans leurs milieux de culture ; ce résultat a été confirmé par TUDDENHAM et al. (306) et PIOVELLA et al. (307) qui ont utilisé la technique, beaucoup plus sensible, de dosage du VIII:CAg.

C - DEVENIR DU vWF SYNTHÉTISÉ PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES

La destination du F vWf synthétisé par les cellules endothéliales est schématisée dans la figure 2 (p. 47). Selon JAFFE et al. (304), le F vWf a une double destination après être excrété, dans la lumière des vaisseaux, dans le sang :

- il s'associe avec le facteur VIII, synthétisé par d'autres cellules que les cellules endothéliales et qui ne sont pas encore identifiées (p. 77-80), pour former le complexe circulant F VIII/vWf intervenant notamment au niveau de la voie endogène de la coagulation,

- il s'adsorbe sur la membrane plaquettaire afin de permettre aux plaquettes de remplir leur rôle physiologique dans l'hémostase primaire (NACHMAN et JAFFE : 308).

Enfin, pour RAND et al. (309), une partie du VIII R:Ag suit une voie tout à fait opposée, puisqu'elle serait déposée dans le sous-endothélium, au niveau de la membrane basale et peut-être associée au collagène. Ce VIII R:Ag sous-endothélial pourrait expliquer les résultats de SAKARIASSEN et al. (310), mettant en évidence, "in vitro", une adhésion plaquettaire au sous-endothélium désendothélialisé sans addition de VIII R:Ag exogène, et pourrait jouer un rôle "in vivo", au site de la lésion vasculaire.

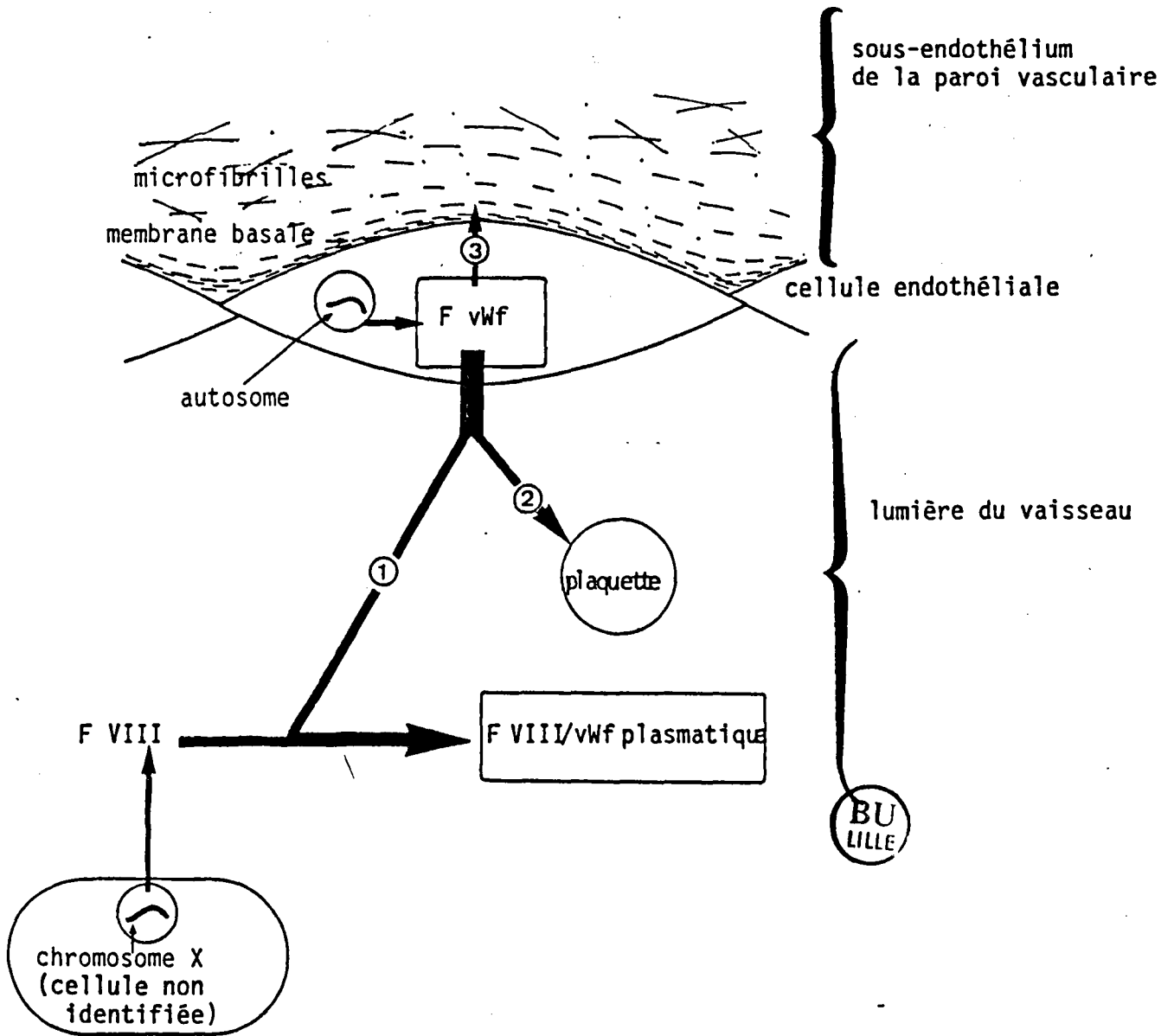


FIGURE 2

SCHEMA DES DIFFERENTES VOIES SUIVIES PAR LE F vWf SYNTHETISE
PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES D'APRES JAFFE ET AL. (304) ET RAND ET AL. (309)

D - REGULARISATION DE L'EXCRETION DU F vWf DANS LE SANG

De nombreuses études ont montré que le taux plasmatique du F VIII/vWf et, en particulier du VIII R:Ag et du VIII R:Rco, peut augmenter rapidement mais transitoirement en réponse à divers stimuli physiologiques ou pharmacologiques et que, dans certaines maladies, il existe des augmentations prolongées de ces activités (cf revues générales de BROZOVIC = 311 et BLOOM = 312). MANNUCCI et al. (313), LUDLAM et al. (314), NILSSON et al. (315, 316) ont montré l'augmentation plasmatique associée du F VIII/vWf et de l'activateur du plasminogène après divers stimuli (=compression veineuse, adrénaline, acide nicotinique, vasopressine) et pensent que ce phénomène très rapide n'est pas dû à une augmentation de synthèse mais plutôt à une accélération de l'excrétion du F vWf et de l'activateur du plasminogène dans le sang. Néanmoins, les travaux récents de TUDDENHAM et al. (317) et de BOOYSE et al. (318), qui ne mettent en évidence aucune augmentation du VIII R:Ag et du VIII R:RCo dans les milieux de culture de cellules endothéliales "stimulées", ne permettent pas de confirmer cette hypothèse.

II BIOCHIMIE DU F vWf

Comme le F vWf représente quantitativement ≈ 99 p.100 du complexe moléculaire F VIII/vWf, on conçoit aisément que la plupart des propriétés physico-chimiques du F VIII/vWf soient applicables au F vWf. Nous ne reviendrons donc pas sur ces données (p. 20 à 35) mais les compléterons simplement par les résultats acquis sur des préparations de F vWf pur, ou tout au moins dépourvu de F VIII, obtenues selon les principes rappelés ci-dessous.

A - ISOLEMENT DE F vWf DEPOURVU DE F VIII

Le moyen le plus simple d'obtenir du F vWf totalement dépourvu de F VIII est d'appliquer l'un des protocoles de préparation de F VIII/vWf à du plasma d'hémophile A majeur dépourvu de VIII:CAg. Evidemment, ce procédé est limité par la quantité de matériel de départ et les renseignements obtenus sur ce type de préparation, étudié la première fois par BOUMA et al. (319), ne sont pas très détaillés.

Les autres procédés d'isolement, à partir de plasma normal, où le F vWf est associé au VIII:CAg, nécessitent de pouvoir contrôler par une technique immunologique, l'absence de F VIII, dans les préparations finales. Dans une première étape, on doit préalablement purifier le complexe F VIII/vWf puis, dans un second temps, dissocier le F VIII du F vWf et les séparer. Diverses conditions permettent de dissocier le F VIII du F vWf : les forces ioniques élevées (NaCl 1M ou CaCl_2 0,25 M) comme nous l'avons vu précédemment (p.28), le milieu de force ionique faible : VAN MOURIK et al. (320), l'échange d'ions : BAUGH et al. (321), la chromatographie sur hydroxyapatite (LIPTON et POOL : 322), l'anhydride succinique (BARROW et GRAHAM : 323), le periodate de sodium (KAELIN : 324), les agents réducteurs faibles (AUSTEN : 325, BLOMBACK et al. : 326), les enzymes protéolytiques (WEISS et KOCHWA : 327, ANDERSON et Mc KEE : 328) et en particulier la thrombine (COOPER et al. : 329). Cependant, il est très probable que ces derniers procédés modifient la structure et les propriétés des molécules dissociées et comme, d'autre part, ils se réfèrent à des travaux assez anciens on ne peut savoir s'ils permettent d'obtenir un F vWf complètement dépourvu

de VIII:CAg. En fait, c'est une préparation de F vWf dépourvue de VIII:C obtenue par échange d'ions de la fraction F VIII/vWf, éluée au Vo d'une colonne de tamisage moléculaire chargée avec un cryoprécipité éthanolique, qui a été l'objet de l'étude biochimique la plus complète (OLSON et al. : 330).

B - STRUCTURE DU F vWf

C'est en 1973 que débute les premiers travaux effectués, à l'époque, dans le but de comparer le "facteur VIII normal du facteur VIII de l'hémophile" et qui peuvent être interprétés, à l'heure actuelle, vu les protocoles de purification adoptés, comme étant une comparaison du F VIII/vWf normal et du F vWf trouvé chez l'hémophile (avec bien sûr l'hypothèse concernant le F VIII:CAg associé au F vWf qui peut être présent, en petite quantité, dans le plasma d'hémophiles A même majeurs). BENNETT et al. (331) montrent que le F vWf isolé du plasma d'hémophile est, tout comme le F VIII/vWf, exclu lors des tamisages moléculaires, il a donc une MM supérieure à 500 000 ; ils précisent que le F vWf, après réduction, donne les mêmes sous-unités de 200 000, et en gradient de saccharose la même répartition, en faveur d'un $S = 30$, que le F VIII/vWf normal. SHAPIRO et al. (332) ajoutent que le F vWf est de nature glycoprotéinique puisque ses sous-unités sont colorées par le bleu de Coomassie et le PAS, qu'il ne se dissocie pas en GuHCl 6M et SDS 1 p.100 et qu'il présente les mêmes bandes que le F VIII/vWf normal après réduction, alkylation et isoélectrofocalisation en gel de polyacrylamide. GRALNICK et al. (333) montrent que le taux d'acide sialique du F vWf de deux hémophiles (37,5 et 42,1 nM/mg de protéine) se situe dans les limites ($38 \pm 7,9$) trouvées à partir du F VIII/vWf isolé de six plasmas normaux. HOLMBERG et al. (334) en 1975 s'attachent, eux, à rechercher une différence au niveau de la copule protéique du "VIII normal" (F VIII/vWf) et du "VIII d'hémophile" (F vWf). Les cartes peptidiques des fragments tryptiques et les 16 bandes séparées en isoélectrofocalisation après coupure au CNBr sont identiques. OLSON et al. (335) ont étudié des préparations de F vWf humain et porcin, certainement dépourvues de VIII:CAg car ne neutralisant pas des anticorps anti-VIII:C homologues. Les principaux renseignements fournis sont les suivants = une unité de VIII R:RCO, qui est par définition la quantité contenue dans 1 ml de plasma normal, correspond à 5,5 μ g de protéine et a une absorbance

à 280 nm = 0,006 ; le taux de lipides du F vWf est d'environ 1,5 p.100, la majorité des lipides sont neutres (mono, di, triglycérides, cholestérol, esters de cholestérol et quelques acides gras libres) mais il existe un peu de phospholipides ; la composition en acides aminés est reportée dans le tableau X (p. 52), le calcul en nombre de résidus nous a permis de comparer leurs valeurs à celles rapportées pour le F VIII/vWf. Ils ne détectent pas d'osamines mais, cependant, ils avouent que leur limite de détection ne permettrait de les doser que si ces monosaccharides représentaient plus de 12 p.100 de la protéine. Enfin, plus récemment, le F vWf porcine préparé par FASS et al. (336) selon le protocole de OLSSON (335) permet de montrer que la répartition multimérique du F vWf est identique à celle du F VIII/vWf (p.21, 22) et que, donc, le F VIII n'intervient certainement pas dans la "polymérisation" des sous-unités du F vWf.

Comme le soulignent ces auteurs (336), il reste encore de nombreuses inconnues concernant la structure du F vWf : la présence d'une molécule "de jonction" entre les sous-unités ne peut pas être écartée car, si elle est de faible MM, elle ne peut être mise en évidence. D'autre part, si on sait que le F vWf comporte une fraction glycanique, on ne connaît pas encore ne serait-ce que la composition centésimale et molaire de ses différents monosaccharides. De plus, il faut ajouter que les renseignements concernant la partie protéique du F vWf sont encore très incomplets = la composition des acides aminés n'a été précisée qu'une seule fois et, bien qu'on ait commencé d'établir des cartes peptidiques, la séquence des acides aminés est encore inconnue.

TABLEAU X

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DU F vwf HUMAIN, D'APRES OLSON

ET AL. (335), EN COMPARAISON AVEC LA MOYENNE DE CELLES DU

F VIII/vwf HUMAIN (TABLEAU VI P.32)

	F vwf	F VIII/vwf	
		Moyenne	Extrêmes
Lys	47,74	46,2	39,9 à 50,8
His	26,33	21,9	17,3 à 27,2
Arg	34,14	42,3	35,8 à 48,2
Asp	91,92	82,9	69,8 à 103
Thr	53,31	50,8	49,5 à 60,1
Ser	85,42	73,8	63 à 87,7
Glu	132,14	104,8	89,9 à 114,9
Pro	42,80	59,5	52,1 à 66,0
Gly	123,79	73,1	62,9 à 86,9
Ala	72,68	50,2	43,8 à 54,3
Val	62,83	69,3	59,6 à 77,8
Met	12,04	12,9	8,4 à 25,1
Ile	32,68	32,5	31,2 à 34,5
Leu	62,19	64,4	48,8 à 72,2
Tyr	20,16	20,1	17,8 à 23,0
Phe	20,52	25,5	24,0 à 27,0

BU
LILLE

III - IMMUNOLOGIE - DU - F - vWf

A - LES ANTICORPS HETEROLOGUES

Nous avons vu précédemment, dans le chapitre concernant l'immunologie du F VIII/vWf (p.37 et 39), que les anticorps hétérologues polyclonaux ont toujours une activité anti-VIII R:vWf, alors que, si ils sont monoclonaux, ils sont dirigés électivement tantôt contre la partie F vWf tantôt contre la partie F VIII du complexe moléculaire antigénique.

Certains auteurs ont tenté d'obtenir des anticorps hétérologues polyclonaux spécifiquement dirigés contre le F vWf en injectant à l'animal du F vWf purifié, sans activité VIII:C, c'est à dire théoriquement débanassé du F VIII par tamisage en milieu de force ionique élevée ou par immunoabsorption sur anticorps anti-VIII:C homologues. Leurs résultats sont parfois décevants en ce sens que les antisérums obtenus présentent, en plus, d'une activité anti-vWf intéressante, une certaine activité anti-VIII:C qui peut-être attribuée :

- soit à la contamination des préparations de F vWf injectées par des traces de F VIII:CAg,

- soit à l'existence de déterminants antigéniques communs sur les molécules de F VIII et de F vWf (voir chapitre "résultats personnels" p.115 à 125,

- soit encore à l'inhibition non spécifique du VIII:C du complexe F VIII/vWf, consécutive à un réarrangement de la molécule lors de la fixation des anticorps sur la partie F vWf du complexe; dans ce cas les anticorps n'inhibent pas le F VIII non complexé au F vWf (LMW).

B - LES ANTICORPS HOMOLOGUES

Il existe également des anticorps homologues dirigés contre le F vWf, ces anticorps peuvent apparaître chez les malades vWD homozygotes polytransfusés ou spontanément chez certaines personnes

qui développent alors ce qu'on appelle une maladie de vWD acquise.

1) Chez les vWD homozygotes

On peut s'attendre à trouver des anticorps dirigés contre le F vWf chez les patients atteints de vWD dont le taux de F vWf est nul et qui ont du être transfusés fréquemment avec des fractions plasmatiques. De tels malades n'ayant ni VIII R:Ag, ni VIII R:RCo, ni VIII:C sont très rares et sont en fait des homozygotes de cette maladie congénitale (p. 64).

Le premier cas rapporté de vWD homozygote ayant développé un inhibiteur est celui de SARJI et al. (337) ; l'inhibiteur du malade bloque de façon immédiate l'agrégation à la ristocétine d'un PRP normal, mais ne neutralise pas alors l'activité VIII:C. Cependant, chez ce même malade, après stimulation due à de nouvelles transfusions, apparaît un inhibiteur ayant la capacité de neutraliser en partie l'activité VIII:C alors que son taux d'anti-VIII R:RCo augmente (STRATTON et al. : 338). STRATTON et al. (338), montrent en outre que cet inhibiteur qui n'est pas précipitant aurait un comportement, après transfusions, similaire à celui des inhibiteurs anti-VIII:C des hémophiles en ce sens qu'il est d'abord neutralisé puis réapparaît lors d'une réponse anamnétique et qu'il est de nature Ig G Kappa.

D'autres cas d'anticorps homologues apparus chez des vWD homozygotes ont été rapportés par MANNUCCI et al. (339) et SHOA'I et al. (340) qui étudient des populations de vWD du Sud de l'Italie et d'Iran où la découverte de cas d'homozygotie est favorisée par le degré de consanguinité. Dans les 4 cas rapportés (3 par MANNUCCI et 1 par SHOA'I) il s'agit d'anticorps de type Ig G, inhibant surtout l'agrégation à la ristocétine, neutralisant faiblement le VIII:C (titre < 10 Bethesda/ml), mais capables de précipiter, tout comme les anticorps hétérologues, en présence de VIII R:Ag. L'inhibition du VIII:C, étant faible et n'augmentant pas après incubation à 37°C, semble être consécutive à un encombrement stérique au niveau du VIII:C après fixation des anticorps anti-vWf sur le complexe VIII/vWf plutôt qu'à l'existence d'anticorps spécifiques du VIII:C. Ceci est en accord avec les observations de STRATTON

et al. (341) qui montrent que le sérum de leur malade, quand il y a une faible action inhibitrice de l'activité coagulante du VIII/vWf, n'inhibe cependant pas celle du LMW. Lors d'une étude chez 10 vWD sévères, EGBERG et BLOMBACK (342) détectent 2 inhibiteurs, de type Ig G, de l'agrégation à la ristocétine dont l'un chez une malade, probablement homozygote, dont le plasma obtenu après de nouvelles transfusions a un effet anti-VIII R:RCo augmenté et une légère activité anti-VIII:C.

2) Dans la maladie de Willebrand acquise

Il existe de rares cas de personnes chez lesquelles les signes cliniques et biologiques de la maladie de Willebrand paraissent "acquis", les antécédents familiaux et personnels de ces malades permettant d'écarter le diagnostic de forme congénitale de cette anomalie. L'une des hypothèses pouvant expliquer la diminution des taux de VIII R:Ag et du VIII R:RCo chez ces malades est l'apparition d'inhibiteurs de type "anti-vWf" qui simuleraient une maladie de Willebrand, tout comme l'addition d'antisérum hétérologue anti-VIII/vWf à un sang normal reproduit expérimentalement les caractéristiques d'un sang de malade atteint de vWD (MEYER et al. : 343).

Parmi la trentaine d'observations de maladie de Willebrand acquise retrouvées dans la littérature, il existe quelques rares cas où une activité anti-VIII R:Ag (GAZENGEL et al. : 344), ou anti-VIII R:RCo (344 et HANDIN et al. : 345, MAZURIER et al. : p.146) a pu être mise en évidence. Les autres étiologies, non immunologiques, de cette forme acquise de la maladie de vWD seront envisagées, ultérieurement, dans le chapitre "résultats personnels" (p. 145 à 152).

IV. TECHNIQUES DE DOSAGE DU F vWf

A - DOSAGES IMMUNOLOGIQUES

C'est grâce aux travaux de ZIMMERMAN et al. (347) qui ont décrit la préparation d'anticorps hétérologues capables de précipiter un antigène présent dans le plasma normal et d'hémophile A mais absent, ou tout au moins diminué, chez les malades ayant une forme typique de vWD, que les différentes techniques de dosage immunologique de ce qu'on appelle improprement le VIII R:Ag et qui est, en fait, la molécule antigénique liée au F vWf, ont pris leur essort.

La première méthode décrite est celle de ZIMMERMAN et al. (347) qui ont appliqué la technique classique d'électroimmunodiffusion de LAURELL. Cette technique, bien que peu sensible, reste à l'heure actuelle la plus employée car elle est facile à mettre en oeuvre. Elle a été utilisée récemment au cours d'un échange de plasmas, au niveau Européen, et a fait l'objet d'un rapport précisant les différentes variables influençant les résultats (NILSSON : 348).

Depuis, d'autres techniques immunologiques ont été adaptées au dosage de VIII R:Ag, les principales d'entre elles sont reportées dans le tableau XI (p. 57). Les techniques radioimmunologiques par RIA et IRMA sont les plus sensibles; les résultats obtenus inter-laboratoires semblent cependant assez variables (NILSSON et al. : 348) et HOWARD et al. (349) ont montré que la technique IRMA en phase solide ne détecte pas les formes peu polymérisées du F vWf. Ces techniques ont, tout comme le "Laurell sensibilisé" utilisé par ZIMMERMAN et al. (350), le désavantage de nécessiter l'équipement et l'agrément indispensables à l'utilisation de produits radioactifs et c'est pourquoi plusieurs auteurs ont travaillé sur des techniques analogues mais avec des anticorps anti-vWf ou du F vWf couplés à un enzyme (BARTLETT et al. : 351, NESS et al. : 352, YORDE et al. : 353, FISHMAN et al. : 354) ou un produit fluorescent (RUDZKI et al. : 355, YODER et al. : 356). Nous développerons plus loin, dans un chapitre de nos travaux personnels (p.135), le problème du dosage immunoenzymatique du VIII R:Ag.

TABEAU XI

PRINCIPAUX TYPES DE TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES DE DOSAGE

DU FACTEUR WILLEBRAND (DOSAGE DU VIII R:Ag)

AUTEURS	PRINCIPE	SENSIBILITE	INCONVENIENT
ZIMMERMAN et al. (357) 1971	Electro-immuno- diffusion quanti- tative	≈ 0,1 U/ml	Erreur par excès en cas d'augmen- tation de mobili- té électrophoré- tique du VIII R:Ag
STITES et al. (358) 1971	Inhibition d'hé- magglutination	> 0,1 U/ml	Semi-quantitative
HOYER et al. (359) 1972	IRMA avec anti-VIII/ vWf marqué, en phase liquide	2×10^{-3} U/ml	Manipulation d'éléments radioactifs
COUNTS et al. (360) 1975	IRMA avec anti-VIII/ vWf marqué, en phase solide	5×10^{-4} U/ml	Préparations des produits marqués
PAULSSEN et al. (361) 1975	RIA avec VIII/vWf marqué, double anticorps	5×10^{-4} U/ml.	
BARTLETT et al. (351) 1976	Technique immuno- enzymatique "ELISA"	≈ 0,1 U/ml	Mesure au spectrophotomètre
ZIMMERMAN et al. (350) 1979	Radio électro- immunodiffusion	1×10^{-2} U/ml 2×10^{-3} U/ml	Utilisation d'anticorps radioactifs
GIDDINGS et al. 1979 (362)	Néphélémétrie	≈ 1×10^{-3} U/ml	Mesure au néphélémètre
RUDZKI et al. (355) 1979	Dosage fluoro- immunologique	2×10^{-2} U/ml	Nécessité d'un fluoromètre
CRANE (363) 1981	Agglutination de latex	5×10^{-4} U/ml	Mesure à l'agré- gomètre

BU
WILLE

B - DOSAGES BIOLOGIQUES

Les anomalies qualitatives du F vwf, dont le degré de gravité est en général reflété par la durée du temps de saignement, peuvent être détectées "in vitro" par différentes techniques fondées sur l'activité fonctionnelle du F vwf qui permettent de mesurer :

- l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium (BAUMGARTNER : 364),
- la rétention des plaquettes sur billes de verre (SALZMAN : 365, BOWIE : 366),
- la fixation du F vwf aux plaquettes (KAO et al. : 367),
- l'agglutination des plaquettes en présence de ristocétine (HOWARD et FIRKIN : 368).

Seule, cette dernière technique est facilement adaptable à un dosage proprement dit, reflétant une des activités fonctionnelles du F vWF : l'activité cofacteur de la ristocétine appelée VIII R:RCo.

1.1) Principe de dosage du VIII R:RCo

Les observations de HOWARD et al. qui constatent d'abord (368) une agrégation diminuée ou nulle lorsque de la ristocétine à 1 mg/ml est ajoutée à un plasma riche en plaquettes de malades atteints de vWD et, ensuite, que ce défaut peut être corrigé par addition de plasma normal (369) ou de facteur VIII/vwf purifié (WEISS et al. : 370) ont permis d'utiliser le test simple d'agrégation des plaquettes de malade en présence de ristocétine (RIPA : Ristocetin Induced Platelet Agregation) pour diagnostiquer la maladie de vWD. Néanmoins ce test a ses limites (cf revue générale de KOUTTS et al. : 371) :

- il n'est perturbé qu'en cas de déficit important en VIII R:RCo,

- il est perturbé dans certaines anomalies congénitales (la maladie de Bernard-Sculier, la thrombasthénie, la thrombopathie dite de "pool vide") et acquises (purpura thrombocytopénique idiopathique, mononucléose infectieuse et leucémie aigue).

- enfin, on a constaté récemment que la RIPA peut être augmentée dans certaines formes atypiques de maladie de Willebrand (type II-B et II-C) (RUGGERI et al. : 372, TAKAHASHI:37)

Le diagnostic de vWD est, par contre, beaucoup plus fiable s'il est fondé sur le dosage proprement dit du VIII R:RCo, dosage qui peut se faire selon différentes techniques résumées dans le tableau XII (p.60), toutes fondées sur le même principe : à des plaquettes dépourvues de F VIII/vWf périplaquettaire on ajoute un échantillon de différentes dilutions d'un plasma témoin (contenant par définition 1 U de VIII R:RCo/ml) ou du plasma du malade ou de la préparation à analyser, et une dose fixe de ristocétine (concentration finale = 1,2 mg/ml) et on mesure l'agglutination des plaquettes.

2) Techniques de dosage du VIII R:RCo

A défaut de plaquettes de malades atteints de vWD sévères incapables d'agrèger en présence de ristocétine sans addition préalable de F vWf exogène, on emploie, selon les techniques, : des plaquettes normales préalablement mises en présence d'un antisérum anti-VIII/vWf hétérologue qui neutralise le VIII/vWf périplaquettaire (MEYER et al. : 374), ou des plaquettes normales lavées plusieurs fois utilisées extemporanément (WEISS et al. : 375) ou après fixation par le formol (KIRBY et al. : 376). L'agrégation est mesurée soit par mesure de la densité optique, elle est alors quantifiée soit par l'intensité (WEISS et al. : 375) ou la vélocité (JENKINS et al. : 377) de la réaction, soit par la mesure de la durée du temps nécessaire à l'apparition d'agglutinats détectables à l'œil nu (ALLAIN et al. : 378), soit encore par comptage des plaquettes en suspension avant et après formation des agglutinats (EVANS et AUSTEN: 379).

3) Limites du dosage du VIII R:RCo

NILSSON (380) a souligné, après une étude inter-laboratoire, que le dosage du VIII R:RCo est moins fiable que le dosage du VIII R:Ag, surtout en ce qui concerne les taux modérément abaissés. Il faut souligner également que, bien qu'il y ait chez les malades vWD une bonne corrélation entre le taux de VIII R:RCo mesuré "in vitro" et l'activité vWf appréciée à la fois par le temps de saignement et la gravité du syndrome hémorragique (WEISS et al. : 381), on constate cependant une discordance dans certains cas : - dans la maladie de Willebrand atypique, le VIII R:RCo peut être normal alors que le temps de saignement reste allongé : durant la grossesse, les épisodes infectieux et après transfusions (RATNOFF

et al. : 382, WEISS : 383). - Il existe de plus des malades présentant des formes atypiques de la maladie de vWD avec manifestations hémorragiques et TS allongé mais taux de VIII R:RCo normal ou peu diminué. Ces discordances amènent à souligner que le dosage du VIII R:RCo ne mesure que la fonction "cofacteur de la ristocétine" du facteur Willebrand et ne reflète donc pas toujours la fonction biologique complexe (VIII R:vWf) de ce facteur.

TABLEAU XII
DIFFERENTES TECHNIQUES DE DOSAGE DE L'ACTIVITE
VIII R:RCO DU F vWf

LPU LILLE	AUTEURS	CONDITIONS OPERATOIRES
	WEISS <u>et al.</u> (384)	Plaquettes lavées (utilisées extemporanément, Relation linéaire : Log-intensité agrégation - Log-taux de VIII R:RCo
	MEYER <u>et al.</u> (385)	Plaquettes lavées ou plaquettes "neutralisées" par antisérum anti-VIII/vWf, Relation linéaire : Log-vélocité agrégation - Log taux de VIII R:RCo
	ALLAIN <u>et al.</u> (386)	Plaquettes lavées et fixées au formol, Relation linéaire : Log-temps d'apparition des agrégats - Log-taux de VIII R:RCo
	EVANS <u>et al.</u> (387)	Plaquettes fixées au formol et lavées , Dilution des échantillons à analyser en solution contenant 6 p.100 d'albumine Relation linéaire : Pourcentage de plaquettes sédimentées - Log-taux de VIII R:RCo
	ZUZEL <u>et al.</u> (388)	Plaquettes lavées et fixées au formol, Dilution des échantillons à analyser dans du plasma de vWD sévère, Relation linéaire : Vélocité agrégation - Taux de VIII R:RCo

V. PATHOLOGIE LIEE AU F vWf

On regroupe sous le terme de maladie de von Willebrand (vWD) les désordres hémorragiques liés au F vWf. Une mise au point régulière des problèmes cliniques, biologiques, génétiques et thérapeutiques concernant cette maladie a fait l'objet de nombreuses revues générales (cf: HOYER : 389, SULTAN : 390, BLOOM : 391) aussi ne donnerons nous ci-dessous que quelques éléments physiopathologiques et la tendance actuelle de la classification de cette maladie qui sont nécessaires pour envisager ultérieurement les relations existant entre la structure et la fonction du F vWf.

Le facteur vWf semble également pouvoir jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose et nous développerons ce point dans un second temps.

A - DONNEES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA MALADIE DE WILLEBRAND

La maladie de vWD se manifeste par un syndrome hémorragique atteignant essentiellement les muqueuses et se traduit par des hémorragies nasales, gingivales, amygdaliennes, digestives et méno-métrorragiques. Ce type d'hémorragie est en grande partie dû à un défaut de l'hémostase primaire reflété par l'allongement du temps de saignement (TS) ; il se comprend lorsqu'on sait le rôle crucial que joue le F VIII/vWf dans l'hémostase primaire (cf p.12 à 16), rôle qui revient entièrement au F vWf du complexe et non au F VIII puisque le TS est tout à fait normal chez les hémophiles A majeurs dont le plasma est totalement dépourvu de VIII:CAg.

Il faut noter néanmoins que le rôle du F vWf ne se cantonne pas à l'hémostase primaire car il intervient, de façon indirecte, dans la coagulation en "régulant" le taux plasmatique de F VIII par un mécanisme encore inconnu.

Plusieurs constatations sont à la base de cette énigme:

- le F VIII:C est souvent diminué (et quelquefois effondré au point que des hémarthroses surviennent chez des patients atteints de vWD) chez les malades vWD bien que ceux-ci aient la "capacité génétique" de synthétiser un VIII:CAg normal, n'ayant aucune atteinte au niveau de leur chromosome X.

- à maintes reprises, on a constaté, après NILSSON et al. (392), une réponse " anormale" des vWD après transfusion : ces malades après injection de diverses fractions dérivées du sang (plasma, cryoprécipité, concentrés de AHA) présentent une augmentation "retardée et prolongée" du VIII:C (et du VIII C:Ag) qui peut être attribuée à un apport de F vWf puisqu'elle se manifeste également après injection de plasma d'hémophile A majeur (HOYER : 393). Il semble donc que la présence de F vWf soit nécessaire pour obtenir un taux normal de F VIII dans le sang. On peut imaginer que le F vWf, en tant que "molécule porteuse du VIII", serve de "bouclier" à celui-ci et le protège, soit de l'inactivation (WEISS et al. : 394) par des enzymes protéolytiques plasmatiques par exemple, soit d'un catabolisme rapide, peut être par l'intervention des exoglycosidases hépatiques. Certains pensent aussi que le F vWf peut influencer la synthèse, ou l'excrétion dans le sang, du VIII:CAg (BLOOM : 395).

B - CLASSIFICATION BIOLOGIQUE DES DIFFERENTS TYPES DE vWD

La maladie de Willebrand ne forme un groupe homogène de malades que si on regroupe sous ce nom de vWD, presque comme à l'origine de sa définition, les patients des deux sexes, ayant un temps de saignement allongé, avec un chiffre de plaquettes et une rétraction du caillot normaux, et, au moins, une des caractéristiques liées au F VIII/vWf (VIII R:RCo, VIII R:Ag, VIII:C, mobilité électrophorétique du VIII R:Ag, répartition multimérique du VIII R:Ag...) perturbée. En effet, au fur et à mesure qu'a progressé la mise au point des tests biologiques permettant de mieux connaître le F VIII/vWf, on a pu s'apercevoir que les résultats sont très variables d'un malade à l'autre (HOYER : 396). Tous les types de combinaison entre un taux normal, subnormal, diminué ou effondré de VIII:C, VIII R:RCo et VIII R:Ag sont rencontrés à l'exception de malades avec un VIII R:Ag diminué mais, à la fois, un VIII:C et un VIII R:RCo normal. C'est ainsi que, dans les années 74-79, a augmenté progressivement le nombre de "types" différents de la maladie de vWD qui, dans la classification de FIRKIN et HOWARD (397) était de 7. Cependant, ces classifications complexes sont maintenant sujettes à caution au vu des travaux de ABILGAARD et al. (398), montrant que les examens biologiques (TS, VIII:C, VIII R:Ag, VIII R:RCo...) ne sont pas reproductibles, d'un prélèvement à l'autre, chez les mêmes malades sauf dans les formes homozygotes de la maladie, et de BLOOM et al. (399) montrant que différents types de vWD peuvent coexister dans une même fratrie.

Le tableau XIII (p.64) résume les données essentielles des tendances de la classification actuelle mais aucune classification n'est encore adoptée par tous. Dans la forme congénitale de la maladie de Willebrand, transmise sur le mode autosomal récessif ou dominant, on distingue :

- le type I. C'est la forme typique de la maladie, dans laquelle on différencie les formes sévères se caractérisant par un taux effondré de VIII R:Ag, et de VIII R:RCO, qui semble consécutif à une absence de synthèse du F vwf car ces malades peuvent développer des anticorps anti-vwf, après transfusions répétées. Les formes modérées, elles, présentent des taux variables et dissociés de VIII R:RCO, de VIII R:Ag et de VIII:C, qu'on attribue à une "pénétrance variable" de la tare au niveau de l'autosome contrôlant la synthèse du F vwf. Chez ces malades il y a absence ou diminution de toutes les formes multimériques du F vwf.

- le type IIA. La caractéristique essentielle du F vwf de ces malades est de manquer de formes multimériques "lourdes" et "intermédiaires". Cette anomalie, qui semble due à un défaut de polymérisation, se traduit par une augmentation de la mobilité électrophorétique du VIII R:Ag, par un non-parallélisme des courbes de dosage du VIII R:Ag en IRMA, et par une diminution de l'activité vwf qui est liée à l'absence des formes hautement polymérisées du F vwf.

- le type IIB. Les plaquettes de ces malades, en suspension dans du plasma autologue, agrègent en présence de doses faibles de ristocétine, insuffisantes pour faire agréger un PRP normal. Leur F vwf se fixe plus, "in vitro", aux plaquettes normales que le F vwf normal et cette "hyper-liaison" aux plaquettes se traduirait "in vivo" par la disparition des formes hautement polymérisées du F vwf plasmatique qui serait à l'origine de leur syndrome hémorragique.

Les malades présentant des formes IIA et IIB de vWD synthétisent donc un F vwf anormal ; ils sont appelés "variants" de vWD, par opposition aux formes typiques où il y a un défaut quantitatif de synthèse.



TABEAU XIII

CARACTERISTIQUES ESSENTIELLES DES DIFFERENTES FORMES DE MALADIE DE WILLEBRAND CONGENITALE

- Temps de saignement allongé
- Au moins une des caractéristiques du F VIII/vWf perturbée

Type I
formes homozygotes (sévères)
vWD typique dû à une diminution de synthèse du F vWf
formes hétérozygotes (modérées)

Type II_A
agrégation à la ristocétine : diminuée ou normale, "variant" de vWD dû à la synthèse de F vWf anormal

Type II_B
agrégation à la ristocétine augmentée, "variant" de vWD dû à la synthèse de F vWf anormal

Type II_C
"pseudo-vWD" avec synthèse normale de F vWf normal
agrégation à la ristocétine augmentée

Taux de VIII R:RCo, VIII:C, VIII R:Ag constamment effondrés
Agrégation à la ristocétine : absence
Apparition possible d'anticorps après transfusion

Dissociation des taux de VIII R:RCo, VIII:C, VIII R:Ag ("pénétrance variable de la tare")
Variabilité des résultats
Toutes les formes multimériques du VIII R:Ag sont diminuées

Défaut de polymérisation du F vWf
Seules les formes légères sont présentes
le VIII R:Ag a donc une mobilité électrophorétique augmentée

"Hyper-liaison" du F vWf aux plaquettes normales
Les formes les plus polymérisées du F vWf n'existent pas dans le plasma

Anomalie plaquettaire entraînant une "hyper"-liaison des formes lourdes du F vWf.
Les formes les plus polymérisées du F vWf n'existent pas dans le plasma

- enfin, le type IIC. Dans ce type on regroupe des malades dont le syndrome hémorragique est d'origine plaquettaire, et que l'on appelle, également de ce fait, "pseudo-Willebrand" (WEISS et al. : 400, HOYER : 401). Nous les avons fait figurer dans le tableau, bien que leur synthèse du F vWf soit quantitativement et qualitativement normale, car leur "hyper-réactivité" plaquettaire, induisant une augmentation de la fixation du F vWf, se traduit également par des anomalies du F VIII/vWf plasmatique.

Pour être complet, il faut noter également :

- les formes de vWD associées à des anomalies plaquettaires ou à un déficit en XII dont KOUTTS et al. (402) ont rassemblé les diverses observations mais dont l'étude n'a apporté, jusqu'à présent, aucun élément nouveau en ce qui concerne le complexe F VIII/vWf :

- et l'existence de formes acquises de la maladie de vWD, qui peuvent être dues soit à la présence d'anticorps anti-vWf, soit à un catabolisme augmenté du F vWf, soit encore à une rétention anormale de ce facteur au niveau de tumeurs ou de certaines cellules sanguines (voir p. 150 à 152).

C - ROLE DU F vWF DANS L'ATHEROSCLEROSE

L'athérosclérose se rencontrant non seulement chez l'homme mais aussi chez d'autres mammifères, tel le porc, l'équipe de BOWIE et al. (403), qui maintient depuis plusieurs années un élevage de porcs ayant une forme sévère de vWD, a pu étudier le rôle du F vwf dans la genèse de cette maladie.

Les résultats des analyses histologiques des artères de porcs, vWD et normaux, effectuées par FULSTER et al. (404, 405) et BOWIE et al. (406) montrent des différences significatives : chez les porcs vWD les lésions athéroscléreuses sont beaucoup moins fréquentes et, si les animaux sont soumis à un régime alimentaire riche en cholestérol, on observe des infiltrations graisseuses au niveau de l'intima des vaisseaux mais pas de lésions prolifératives, comme celles observées dans le groupe de porcs normaux élevés dans les mêmes conditions. Ces observations sont complétées par des expérimentations de transplantation de segments aortiques de porcs vWD chez des porcs normaux, et vice versa, qui montrent que l'athérosclérose se développe dans les segments aortiques de porcs vWD transplantés chez des porcs normaux et que, donc, elle semble liée à la présence de F vwf, plasmatique ou plaquettaire, au niveau du vaisseau (FULSTER et al. : 407). Il est alors tentant de postuler que, c'est en diminuant l'interaction plaquettes/paroi, que le déficit en F vwf empêche l'apparition des plaques athéroscléreuses car on sait, depuis les travaux de ROSS et al. (408), que les plaquettes libèrent un facteur, le PDGF ("platelet derived growth factor), qui stimule la prolifération des cellules des muscles lisses de la paroi vasculaire qui est à l'origine de la plaque d'athérome.

Cette hypothèse séduisante qui prête au F vwf un rôle important dans la genèse de l'athérosclérose doit être cependant discutée. En effet, une étude récente de GRIGGS et al. (409) montre que les coronaires dénudées de porcs, qu'ils soient normaux ou vWD sévères, sont le siège de lésions athéroscléreuses et que, par conséquent, le F vwf ne serait qu'une des covariables dans le phénomène complexe d'apparition de la plaque d'athérome. De plus, des observations chez l'homme de SILWER et al. (410) et de KERNOFF et al. (411) ne confirment pas les observations

faites sur le porc : l'autopsie de malades atteints de forme, même sévère, de vWD a permis de déceler des plaques athéroscléreuses. Pour savoir si, réellement, le F vWf intervient dans le développement de l'athérosclérose chez l'homme il faut attendre notamment les conclusions d'un groupe de l'institut national de la santé et de l'organisation européenne de la recherche sur la thrombose (ETRO) qui, dans un projet appelé ROKITANSKI-DUGUID, prévoit, après avoir répertorié environ 1077 patients atteints de la maladie de Willebrand sévère (WEISS et al. : 412), de rechercher chez ces personnes, par des techniques non traumatisantes, des signes d'athérosclérose.

VI RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DU F vWF

Ce que l'on connaît actuellement des relations existant entre la structure et l'activité du F vWf découle de deux types d'expérimentations :

- des études structurales qui ont été faites sur le F vWf "anormal" des malades présentant une anomalie qualitative de ce facteur ("variants" de vWD). Elles sont rares et superficielles car elles ne peuvent, de par la quantité de plasma de départ disponible, prétendre à une étude structurale complète du F vWf anormal, d'autant plus que, nous venons de le voir (p.49 à 52), la structure du F vWf normal est encore mal connue.

- d'études fonctionnelles réalisées sur des préparations de F vWf normal ou modifié par divers agents chimiques ou enzymatiques.

Les résultats obtenus soulignent l'importance du degré de polymérisation et de la copule glycanique du F vWf, deux éléments que nous envisagerons successivement.

A - STRUCTURE "SPATIALE"/ACTIVITE VIII R:vWf

1) Etude du F vWf modifié

Après les travaux de COUNTS et al. (413) et BLOMBACK et al. (414) montrant que, dans des conditions réductrices, l'activité VIII R:RCo du F VIII/vWf diminue alors que son activité VIII:C reste inchangée, diverses équipes ont montré que ce sont les formes hautement polymérisées du F vWf (formes appelées VHMW : Very High Molecular Weight) qui, "in vitro," sont le support de l'activité VIII R:vWf. En effet, DOUCET-de BRUINE et al. (415) ont d'abord montré qu'après addition de plaquettes lavées et de ristocétine à une préparation de F vWf, on obtient, dans le surnageant, du F vWf de masse moléculaire inférieure et de mobilité électrophorétique augmentée ressemblant au F VIII R:Ag du surnageant de cryoprécipitation. LEGRAND et al. (416) ajoutent que ce sont les formes de plus haut poids moléculaire qui interviennent dans l'adhésion des plaquettes au collagène. SAKARIASSEN et al. (417) confirment ces résultats en étudiant l'adhésion au sous-endothélium, MARTIN et al. (418) ajoutent que ce sont les formes les plus polymérisées du F vWf humain qui ont l'activité VIII R:RCo la plus élevée mais remarquent que cette activité ne dépend pas seulement de la MM des polymères mais aussi de leur conformation, sous dépendance de l'agencement des ponts disulfure.

Tous les résultats résumés ci-dessus, obtenus en étudiant les différentes formes multimériques du F vWf normal ou modifié tendent à montrer que le degré de polymérisation du F vWf joue un rôle important pour ses différentes activités mesurables "in vitro". Le degré de polymérisation intervient-il aussi dans l'activité physiologique du F vWf c'est à dire celle qui retentit sur le temps de saignement ?

2) Etude chez les vWD

L'étude de la répartition des multimères du F VIII/vWf chez les variants de la maladie de vWD tend à prouver que oui. En effet, MEYER et al. (419) montrent que, dans les variants dits vWD de type II, les polymères de VHMW sont absents alors que les formes légères du F vWf sont augmentées. RUGGERI et al. (420) ajoutent qu'il existe deux formes de variants :

- dans le type IIA il y a prédominance dans le plasma des 5 plus petits multimères du F vWf et les formes VHMW n'existent ni dans le plasma, ni dans les plaquettes, et l'agrégation à la ristocétine est diminuée,

- dans le type IIB : les VHMW sont absentes dans le plasma où existent des formes "légères" et "intermédiaires" pouvant atteindre 8.5×10^6 daltons, alors que toutes les formes multimériques sont présentes dans les plaquettes. Le F vWf anormal a un comportement bien particulier "in vitro" : il se fixe aux plaquettes à des concentrations de ristocétine inférieures à celles requises pour fixer un F vWf normal et, de plus, des formes plus petites que celles se fixant normalement aux plaquettes sont impliquées dans cette fixation. On ne connaît pas encore l'origine de cette "hyper"-réactivité du F vWf chez ces patients.

3) Comparaison des 2 types d'expérimentations

Récemment GRALNICK et al. (421) ont étudié le comportement de F vWf normal, natif ou partiellement réduit, et de F vWf anormal d'un malade vWD, dans le test de fixation aux plaquettes en présence de ristocétine. Les résultats de la première colonne du tableau XIV (p.70) montrent que, si le F vWf réduit partiellement se fixe moins bien aux plaquettes que le F vWf normal, ce qui est en accord avec les résultats ci-dessus

TABLEAU XIV

CARACTERISTIQUES DE LA FIXATION, AUX PLAQUETTES NORMALES EN PRESENCE
DE RISTOCETINE, DE DIVERSES FORMES DE F VIII/vwf (GRALNICK et al. : 421)

BU III	Facteur VIII/vwf natif		Asialo- F VIII/vwf		Asialo- agalacto-F VIII/vwf	
	Kd	n	Kd	n	Kd	n
F VIII/vwf normal	2,0	1,5	2,0	1,4	15,1	2,8
F VIII/vwf normal après réduction avec β-mercaptoéthanol à 0,01 p.100	5,2	2,1	5,8	2,2	13,4	3,6
F VIII/vwf anormal d'un malade vWD	14,9	4,8	-	-	-	-

Kd = Constante de dissociation en nanomoles₄
n = Nombre de molécules par plaquette x 10⁴

puisqu'il ne contient plus de formes VHMW, il n'est cependant pas aussi mal fixé que le F vWf anormal isolé du plasma d'un malade vWD ayant cependant, comme lui, des formes multimériques s'échelonnant entre 1,1 et $6,9 \times 10^6$ daltons. Ce résultat laisse penser que le degré de polymérisation n'est donc certainement pas l'unique élément intervenant dans l'activité biologique du F vWf.

B COPULE GLYCANNIQUE/ACTIVITE VIII R:vWf

1) Etude chez les vWD

GRALNICK et al. (422) ont été les premiers à noter, chez trois patients atteints d'une forme de variant de vWD, l'absence de coloration au réactif de Schiff de la sous-unité du F VIII/vWf. Cette anomalie est confirmée par ces mêmes auteurs (423) qui démontrent, un peu plus tard, qu'elle est due à une modification des glycannes puisque chez 2 des malades vWD étudiés il y a une diminution nette du taux d'acide sialique (les résultats annoncés étant de 17,5 et 14,5 n moles/mg de protéine alors que pour le F VIII/vWf normal de 6 plasmas témoins ce taux serait de $38,3 \pm 7,9$ n moles/mg). DE MARCO et SHAPIRO (424) trouvent, eux, que le taux normal d'acide sialique est de 131 ± 16 n moles/mg et qu'il existe une diminution à 75 n moles/mg chez 1 des 2 vWD de type IIA étudiés. Récemment GRALNICK et al. (425) ont comparé la composition glycannique du F VIII/vWf isolé à partir de 2,5 l de plasma d'un malade vWD à celle du F VIII/vWf isolé de 7 mélanges de plasmas normaux. Si les valeurs annoncées sont bien différentes, en ce qui concerne l'acide sialique, de celles publiées en 77 (426) il est cependant évident, comme on peut le voir dans le tableau XV (p.72), que le malade étudié a un déficit à la fois en acide sialique, galactose et N-acétylglucosamine. Cependant, la fréquence de l'anomalie de la copule glycannique du F VIII/vWf de vWD est mise en doute par ZIMMERMAN et al. (427) qui n'obtiennent un rapport coloration au bleu de Coomassie/coloration PAS augmenté que chez 1 malade (de type IIA), sur 16 vWD étudiés (de type I ou IIA), qui est justement un des malades cités par GRALNICK et al. (426,428). Cependant, GRALNICK et al. (429) viennent de montrer que, bien que l'acide sialique représente plus de 30 p.100 de la fraction glycannique du F VIII/vWf normal, sa désialylation n'affecte pas son rapport de coloration Coomassie/PAS ; en fait ce rapport n'augmente que s'il y a également une diminution

TABLEAU XV
COMPOSITION GLYCANNIQUE, EN NANOMOLES PAR MG, DU F VIII/vWF NORMAL
ET ISOLE DU PLASMA D'UN MALADE vWD (GRALNICK et al. : 425)

	F VIII/vWF NORMAL (moyenne et déviation standard de 7 mélanges de plasmas témoins)	F VIII/vWF ANORMAL (valeurs extrêmes et moyennes de 2 détermi- nations au moins sur le plasma du même malade vWD)
BU LILLE Acide sialique (hydrolyse acide)	145 ± 14	46-69, 60
Galactose (libéré par β-galactosi- dase après désialylation)	143 ± 12	60-69, 66
Galactose (libéré par hydrolyse acide)	165 ± 18	90-105, 95
N-Acétyl glucosamine	163 ± 30	47-63, 55

du galactose pénultième. Il apparait donc que ce rapport n'est qu'un moyen très grossier pour détecter une anomalie glycanique du F VIII/vWf puisqu'il n'est modifié que s'il y a un déficit d'environ 50 p.100 de la copule glycanique.

L'utilisation de la Concanavoline A (Con A), lectine spécifique des groupements α -glucose et α -mannose semble, elle, plus intéressante. En effet, après que PEAKE et BLOOM (430) aient montré une diminution de la précipitation du F VIII/vWf plasmatique en présence de Con A chez certains vWD atypiques, TAKAHASHI et al. (431) et HOWARD et al. (432) ont confirmé en partie cette observation. Ces derniers (433) ont mis au point une technique de radio-immunoélectrophorèse croisée en présence de Con A qui leur a permis de détecter une anomalie de la fixation à la Con A chez 12 malades présentant un vWD modéré et dans le surnageant de cryoprécipité. Ces résultats leur permettent de dire que les formes peu polymérisées du F VIII R:Ag, telles que celles rencontrées dans le surnageant de cryoprécipité et chez certains vWD, comportent une partie glycanique réduite ou moins accessible à la Con A.

2) Etude du F vWf modifié

Les effets d'exoglycosidases et en particulier de neuraminidases sur l'activité du F vWf sont l'objet de controverses. En effet, plusieurs auteurs ont montré que la libération de l'acide sialique n'affecte pas la fonction du VIII R:RCo du F vWf ni sa fixation aux plaquettes (KIRBY et MILLS : 434, VERMYLEN et al. : 435, FUKUI et al. : 436, DE MARCO et SHAPIRO : 437, MORISATO et GRALNICK : 438, GRALNICK : 439 et al. 440) tandis que d'autres trouvent que la désialylation induit une diminution importante de l'activité du F vWf (SODETZ et al. : 441, ROSENFELD et KIRBY : 442, KAO et al. : 443). Pour VERMYLEN et al. (444, 445) et DE MARCO et SHAPIRO (446) la désialylation a comme effet de permettre au F VIII/vWf d'agglutiner les plaquettes en absence de ristocétine, elle diminue en outre considérablement la demi-vie du F VIII/vWf chez le lapin, qui passe de 240 min à 5 min (SODETZ et al. : 447).

Si l'importance de l'acide sialique en position terminale non réductrice n'est pas universellement prouvée, le rôle du galactose en position pénultième, lui, fait l'unanimité : GRALNICK (448) ont montré l'importance du galactose dans l'agrégation à la ristocétine : la galactose-

oxydase diminue de 90 p.100, cette fonction qui peut-être restaurée ultérieurement par réduction et SODETZ et al. (449) et KAO et al. (450) ont confirmé le rôle du galactose. MORISATO et GRALNICK (451) montrent que la β -galactosidase induit une diminution de 75 p.100 de la fixation du F vWf aux plaquettes et de plus 80 p.100 de son activité VIII R:RCo. KAO et al. (450) ont étudié la concentration nécessaire pour inhiber 50 p.100 de la fixation de F VIII/vWf normal et la constante de dissociation lors de la fixation de différentes formes de F VIII/vWf natif, désialylé, et oxydé sur le galactose. Leurs résultats reportés dans le tableau XVI (p.75) montrent l'importance du groupement glycanique du F vWf, et notamment de galactose, dans l'interaction F VIII/vWf/plaquettes, en présence de ristocétine. Récemment GRALNICK et al. (452) ont confirmé ce fait et leurs résultats sont reportés dans le tableau XIV (p.70) montrant que la fixation du F VIII/vWf n'est pas modifiée ($K_d=2,0$) si on désialyle le F VIII/vWf mais que le fait d'enlever ultérieurement le galactose diminue considérablement cette fixation au point que sa constante de dissociation (15,1) devienne très proche de celle (14,9) obtenue avec un F VIII/vWf anormal isolé d'un sujet vWD.

En résumé, l'ensemble des résultats ci-dessus montre que la structure macromoléculaire du F vWf et sa copule glycanique jouent un rôle primordial dans son interaction avec les plaquettes "in vitro" et que ces éléments, au vu des anomalies constatées chez les vWD, interviennent certainement dans l'activité physiologique du F vWf au niveau de l'hémostase primaire. On peut trouver dans l'article de FURLAN et al. (453) un élément d'explication à l'intervention simultanée de la structure polymérique et de la copule glycanique : en effet, ces auteurs montrent que les formes VHMW du F vWf ont une affinité plus grande pour les lectines de Ricin spécifiques du galactose. On peut donc penser que c'est parce qu'elles sont plus riches en Gal ou qu'elles ont des résidus de Gal plus accessibles (GRALNICK : 454) que les formes très polymérisées du F vWf sont le support de l'activité Willebrand à moins, mais ceci est hypothétique, que les glycanes du F vWf ne soient nécessaires à sa polymérisation.

TABLEAU XVI

ROLE DE LA COPULE GLYCANNIQUE DU F VIII/vWF DANS SON AFFINITE POUR LES PLAQUETTES ET SON ACTIVITE AGREGANTE EN PRESENCE DE RISTOCETINE (KAO et al.:450)

	Ac. Sialique n mole/mg proteine	Galactose n mole/mg proteine	Activité VIII R:RCo Vitesse d'agrégation	Affinité pour les plaquettes en présence de ristocétine	
				concentra- tion, en µg/ml, inhibant 50 p.100 de la fixation de F VIII/vWf normal	Kd (nM)
F VIII/vWf natif	115,4 ± 1,4	165,3 ± 14,8	11,3	2,0	1,1
Asialo-, F VIII/vWf	29,3 ± 1,4	169,9 ± 21,5	4,4	14,8	12,5
Asialo-, Galactose oxidés, F VIII/vWf	30,8 ± 3,3	102,3 ± 3,9	2,1	66	53,8
Asialo-, Galactose oxidés puis réduits, F VIII/vWf	35,7 ± 1,6	175,1 ± 7,4	3,7	30	18,9

LE FACTEUR VIII

Le terme facteur VIII (F VIII) est réservé à la partie du complexe moléculaire F VIII/vWf qui est le support :

- de l'activité biologique au niveau de la voie endogène de la coagulation, activité coagulante dénommée VIII:C,
- des sites antigéniques reconnus par les anticorps homologues, neutralisant cette activité VIII:C, qui constituent le VIII:CAg.

Comme le rôle du facteur VIII dans la coagulation a déjà été décrit (p.9), nous nous limiterons ci-dessous à évoquer les problèmes de la synthèse, des propriétés biochimiques et immunologiques, des techniques de dosage et de la pathologie associée à cette entité moléculaire.

I - SYNTHÈSE DU F VIII

Le lieu de synthèse du F VIII n'est pas encore connu aussi envisagerons nous successivement les différentes cellules qu'on a supposé être capables de synthétiser le F VIII, sous le contrôle du chromosome X.

A - LES CELLULES ENDOTHELIALES

Diverses constatations peuvent laisser supposer que le F VIII aurait, sinon la même origine que le F vWf, du moins une étape commune lors de sa chaîne de synthèse :

- la présence de déterminants antigéniques communs sur les molécules support du VIII:C et du VIII R:vWf (PEAKE et BLOOM : 455, KOUTTS et al. : 456, BOUMA et al. : 457, RATNOFF et al. : 458).

- l'absence d'observation de cas de déficit isolé en molécules support de l'activité VIII R:vWf. En effet, les malades présentant un déficit sévère en F vWf ont également une nette diminution du F VIII et il existe souvent, chez les gens sains, comme chez la plupart des vWD, un parallélisme entre le taux plasmatique de VIII:C (F VIII) et de VIII R:Ag (F vWf) - la réponse bien particulière des vWD aux injections de plasma ou de cryoprécipités qui se caractérise par une élévation, plus grande que prévue, du VIII:C et par la persistance de cette activité pendant au moins 24 heures (cf revue générale de HOYER : 459).

Néanmoins, bien que le VIII R:Ag, nous l'avons vu précédemment, ait été localisé dans les cellules endothéliales humaines, aucune activité coagulante VIII:C n'a été décelée au cours des nombreuses expérimentations de cultures de cellules endothéliales. Ces résultats n'excluent toutefois pas totalement l'hypothèse d'un lieu de synthèse identique pour le F VIII et le F vWf car on peut expliquer l'absence de VIII:C dans les cultures endothéliales de plusieurs façons :

- les conditions de production du VIII:C ne sont pas respectées durant les cultures.

- l'activité coagulante VIII:C est détruite par les protéases libérées dans le milieu de culture (ce qui a été démontré par STEAD et Mc KEE : 460, 461).

- le support moléculaire du VIII:C serait inactif et n'acquieserait son activité coagulante qu'une fois libéré dans le plasma. Ceci se ferait, selon SWITZER et al. (462, 463), par action de la thrombine sur un précurseur qui serait en fait la molécule de VIII R:Ag.

En fait, des résultats récents de BLOOM (464) précisent que, non seulement on ne trouve pas de VIII:C dans les surnageants de cultures endothéliales mais que, même l'antigène qui est associé à cette activité (VIII:Ag) en est absent. Ceci n'est compatible avec les deux dernières hypothèses ci-dessus que si on admet que le précurseur ou les produits de dégradation de la molécule support du VIII:C n'ont pas tous les déterminants antigéniques du VIII:Ag. Il apparaît cependant plus vraisemblable que le VIII:CAg ne soit pas synthétisé par les cellules endothéliales mais qu'il soit formé par d'autres cellules alors que sa synthèse, ou son excrétion dans la circulation, pourrait être sous la dépendance de la présence du F vWf dans la circulation ainsi que nous l'avons évoqué précédemment (p61). Différentes cellules ont été supposées pouvoir synthétiser le F VIII:

B - LE FOIE

En 1965, GARDIKAS et al. (464^b) constatent que le sang quittant le foie a un taux de VIII:C supérieur à celui du sang de la veine porte. Diverses expériences de transplantations (MARCHIORO et al. : 465, WEBSTER et al. : 466, 467 et BOWIE et al. : 468) sont en faveur d'une synthèse hépatique du VIII:C mais OWEN et BOWIE (469) ne peuvent démontrer celle-ci dans leurs premiers essais de perfusions. Pourtant, un peu plus tard, ils montrent (470), avec d'autres (BLOOM: 471, SHAW et al. : 472), que cette synthèse est possible à condition que le sang perfusant les foies de rat ou de porcs nouveau-nés contienne du VIII R:Ag.

Néanmoins, plusieurs constatations (BOWIE et al. : 473, CASTILLO et al. : 474, GREENE et RATNOFF : 475) amènent à penser qu'il existe d'autres lieux de synthèse du F VIII.

C - LES LEUCOCYTES

Un rapport préliminaire de ZACHARSKI et al. (476) concernant la synthèse du VIII:C par les leucocytes, est tout d'abord critiqué par RICKLES et al. (477) qui pensent que l'activité coagulante mise en évidence est due à l'interférence du facteur tissulaire mais est de nouveau discuté (HOUGIE : 478, PIOVELLA et al. : 479) depuis les travaux de BLETCHER et al. (480) qui montrent que les leucocytes humains, en présence de phytohémagglutinine, synthétisent une substance procoagulante neutralisable par les anticorps anti-VIII:C homologues. Cette synthèse, qui pourrait se faire également en absence de lectine, permet d'expliquer l'observation d'une rémission du déficit en VIII:C, dosé par 2 techniques différentes, chez un hémophile A, au cours d'une leucémie (BOUHASIN et al. : 481).

D - LA RATE

WEAVER et al. (482), grâce à des transfusions entre chiens normaux splénectomisés et chiens hémophiles, montrent que la rate est impliquée soit dans le stockage soit dans la synthèse du VIII:C.

POOL (483) ajoute que seul l'extrait de rate parmi les extraits de divers tissus (hépatiques, rénaux, moelle osseuse) renferme une activité VIII:C. Des perfusats de rate contiennent de l'activité VIII:C (WEBSTER et PENICK : 484, WEAVER et al. : 482, PABST et al. 485). De plus diverses expériences de greffes de rate (WEBSTER et al. : 486, NORMAN et al. : 487, GROTH et al. : 488) ou d'injection de cellules lymphoïdes spléniques (DESAI et al. : 489) chez le chien hémophile sont suivies d'une élévation de leur taux de VIII:C. Il faut noter que pour DODDS et al. (490) le foie et la rate seraient tous deux impliqués dans la synthèse du VIII:C, le foie synthétisant une substance qui stimulerait la production splénique du VIII:C (DODDS et al. : 491).

E - AUTRES LIEUX DE SYNTHÈSE

Des préparations de rein semblant montrer une activité coagulante VIII:C, cet organe a été impliqué dans la synthèse du VIII:C

(BARROW et GRAHAM : 492). Néanmoins, des transplants de reins chez le porc vWD n'augmentent pas son activité VIII:C (WEBSTER et al. : 493) et le rein ne semble, en tous cas, pas être le seul site de synthèse du VIII:C (HOWARD et al. : 494).

L'ensemble de ces travaux permet de dire qu'on a impliqué, au cours de ces quinze dernières années, de nombreux organes et tissus dans la synthèse du VIII:C. Certains des résultats, fondés sur la technique de dosage du VIII:C en 1 temps, doivent être interprétés cependant avec prudence sachant qu'il existe alors des problèmes d'interférence de facteurs de coagulation activés ou de facteurs tissulaires. A l'heure actuelle, ces travaux devraient être repris et complétés par une recherche immunologique de l'antigène associé au VIII:C. Il paraît toutefois admis que le foie et la rate sont impliqués dans cette synthèse mais, comme ces organes ont de nombreux types de cellules en commun (cellules lymphoïdes, réticulo-endothéliales, endothéliales, macrophages et fibroblastes), il reste désormais à en préciser le site cellulaire exact.

II - BIOCHIMIE DU F VIII

A - DIFFICULTES D'ISOLEMENT

Les publications sur la caractérisation biochimique du matériel purifié ou, tout au moins, hautement concentré, associé à l'activité coagulante VIII:C sont peu nombreuses. Les difficultés rencontrées lors de l'isolement de cette molécule, fondé sur les conditions de dissociation du complexe VIII/vWf décrites précédemment (p28 et 49) sont les suivantes :

- d'abord, le facteur VIII a une concentration plasmatique très faible évaluée à 50 ng/ml et représente moins de 1 p.100 du complexe entier F VIII/vWf qui est déjà difficile à purifier. A titre d'exemple, il a fallu à VEHAR et DAVIE (495) 125 litres de plasma de boeuf pour purifier environ 0,4 mg de F VIII.

- le second problème est que l'activité coagulante VIII:C supportée par le F VIII est labile et qu'il est donc indispensable d'effectuer, au cours de la purification, un dosage immunologique du F VIII; or le dosage du VIII:C:Ag reste une technique délicate, limitée aux laboratoires possédant du plasma de malades ayant des anticorps homologues (cf p.96).

- enfin, le F VIII est très sensible à la protéolyse (la thrombine et la trypsine causant une rapide activation suivie d'une désactivation, la plasmine détruisant l'activité coagulante) et ceci même en présence de très faibles concentrations de protéases (SWITZER et al. : 496).

B - MASSE MOLECULAIRE DU F VIII NATIF ET ACTIVE PAR LA THROMBINE

Le facteur VIII obtenu d'abord par gel filtration en milieu CaCl_2 0,25 M de F VIII/vWf purifié est retardé dans les colonnes de gel filtration, contrairement au F VIII/vWf et au F vWf, mais sa masse moléculaire ne peut être évaluée sur son volume d'élution car celui-ci varie selon les quantités de F VIII injectées sur la colonne (SWITZER et Mc KEE : 497). En gradient de saccharose, il a un coefficient de

sédimentation d'environ 6,75 (RICK et HOYER : 498) ou de 7,25 (HOROWITZ et al. : 499) qui pourrait être en accord avec une MM de 150000 - 200000. Dans le plasma citraté il a un comportement en ultrafiltration en faveur d'une MM de 236000 \pm 12000 (NEWMAN et al. : 500), alors que, dans le plasma hépariné, il présente le comportement d'une molécule de MM = 22000 (ROCK et al. : 501). HOYER et TRABOLD (502) séparent le facteur VIII du complexe F VIII/vwf isolé par immunoabsorption sur anti-VIII R:Ag de lapin en l'éluant par un tampon de force ionique élevée contenant de la serum albumine bovine et un inhibiteur des protéases : le DFP ; lors de tamisage moléculaire sur G200 le F VIII est élué dans des volumes correspondant à un rayon de Stokes de 88 Å et présente, en gradient de saccharose, un S de 8,2, valeurs en faveur d'une MM de 285000. Le F VIII activé par la thrombine jusqu'à 2×10^{-3} U/ml a une MM de 116000 (Rayon de Stokes : 60 Å, 5S) alors que le F VIII inactivé par des concentrations de thrombine de 10^{-3} à 10^{-1} U/ml aurait une MM voisine de 70000 (3,7 S) (HOYER : 503). D'autres auteurs ont avancé d'autres MM. Après une étude par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, KANG et al. (504) détectent une bande de 140000 se dissociant en sous-unité de 48000 en milieu réducteur alors que pour HARRIS et al. (505) la MM est d'environ 116000 et, pour COCKBURN et al. (506), l'action de la thrombine sur le F VIII/vwf se visualise par l'apparition d'une protéine de MM : 85000 qui pourrait être le support du VIII:C. WEINSTEIN et al. (507) ont, eux, analysé en électrophorèse, en gelfiltration et en ultracentrifugation, du plasma traité avec des anticorps anti-VIII:C:Ag marqués à 125 I : leurs résultats sont en faveur d'une MM de 270 000 avec cependant, en électrophorèse, des bandes mineures correspondant à 200000, 135000 et 120000 ; il est à noter qu'aucune de ces bandes n'apparaît lorsque la même analyse est effectuée à partir du plasma de 5 hémophiles A majeurs et que la forme de MM 270000 disparaît lorsque le plasma est préalablement activé par la thrombine alors que la bande correspondant à la MM de 120000 s'intensifie. Récemment, VEHAR et DAVIE (508) et KNUTSON et FASS (509) ont purifié du F VIII à partir de plasma de boeuf et de porc. Sur leurs préparations purifiées environ 300000 fois, ils ont étudié les sous-unités obtenues en présence de concentration élevée de SDS et les modifications apportées par l'action de la thrombine. En ce qui concerne le F VIII humain, les renseignements les plus récents sont apportés par la publication de FULCHER et ZIMMERMAN (510), qui ont purifié environ 154000 fois le F VIII grâce à l'immunoabsorption

du F VIII/vWf sur anticorps monoclonaux anti-VIII RA_g avec élution par le CaCl₂ 0,35 M puis passage sur aminohexyl-Sepharose (AUSTEN 511). Dans des conditions réductrices, l'électrophorèse en acrylamide met en évidence un doublet (MM 79000 et 80000), une bande à 92000 et des bandes faibles de MM s'étalant jusque 188 000. Le traitement par la thrombine fait s'intensifier puis disparaître la bande de 92000 alors que toutes les autres bandes disparaissent et qu'apparaissent un doublet à 71000 et 72000, une bande à 54000 et une bande de 44000. Pour ces auteurs, la bande de 92000 serait due à la forme activée du F VIII, alors que les bandes de 44000, 54000, 71000 et 72000 seraient les témoins précoces d'une protéolyse ultérieure par la thrombine.

C - AUTRES PROPRIETES DU F VIII

Jusqu'à présent, la plupart des travaux concernant le F VIII humain se sont limités à l'étude de sa MM, en milieu dénaturant ou non, et à celle de l'action de la thrombine; on peut cependant penser que le facteur VIII est de nature glycoprotéinique: en effet, TUDDENHAM et al. (512) ont montré que le F VIII purifié par passage sur immunoadsorbant anti-vWf et élution en Ca⁺⁺ 100 à 200 mM est adsorbé sur Con A et ROCK et al. (513) ont précisé que le taux de monosaccharides (ou d'hexoses?) du F VIII, obtenu en NaCl 1 M à partir du F VIII/vWf isolé d'un pool de plasma normal, est de $9,2 \pm 3,8$ p.100 et que l'on distingue, par électro-focalisation, trois bandes de pHi = 3,9, 4,4, et 7,4.

A l'heure actuelle, plusieurs équipes travaillent sur l'isolement du facteur VIII fondé soit sur l'emploi de polyélectrolyte, ou d'échanges d'ions sur QAE-cellulose, ou d'immunoadsorption. Des résultats préliminaires concernant la masse moléculaire et l'étude des peptides obtenus après coupure enzymatique ont été d'ores et déjà présentés. Si on espère pouvoir connaître la structure biochimique du facteur VIII c'est en partie pour savoir s'il sera possible, dans le futur, de synthétiser ce facteur, indispensable au traitement des hémophiles A, par des techniques de génie biologique.

III - IMMUNOLOGIE DU F VIII

Les anticorps spécifiques du F VIII sont essentiellement des anticorps homologues mais, grâce à l'amélioration des techniques de purification du F VIII, certains auteurs ont pu, après immunisation d'animaux, obtenir également des anticorps hétérologues monospécifiques.

A - LES ANTICORPS HOMOLOGUES

Des anticorps homologues apparaissent chez un certain pourcentage d'hémophiles A polytransfusés et également, spontanément, chez certaines personnes n'ayant présenté auparavant aucune anomalie congénitale du facteur VIII.

1) Circonstances d'apparition

Des anticorps appelés anticoagulants apparaissent chez 5 à 15 p.100 des hémophiles A majeurs (STRAUSS : 514, BIGGS : 515, SHAPIRO et HULTIN : 516) et, de façon rarissime, chez des hémophiles A mineurs (BECK : 517). Le mécanisme responsable de cette réponse immunologique, dont le caractère anamnestique conduit à des titres d'anticoagulant très élevés chez les hémophiles dits "répondeurs élevés" (ALLAIN et FROMMEL : 518), est encore inconnu (SHAPIRO : 519) mais des études effectuées dans des familles où il y a plusieurs malades avec anticoagulant, permettent de penser que des facteurs génétiques interviennent (FROMMEL et ALLAIN : 520). Des résultats préliminaires (FROMMEL et ALLAIN : 521, NÚÑEZ-ROLDAN et al. : 522) montrent que deux frères hémophiles ayant tous deux un anticoagulant ont en commun 1 ou 2 haplotypes HLA, mais une étude multicentre permet de conclure que l'apparition d'anticoagulant, si elle est liée à des facteurs génétiques, n'est due en aucun cas à un type particulier du système MHC ni à une association préférentielle de spécificités HLA (FROMMEL et al. : 523).

Chez des personnes non hémophiles, ces anticoagulants peuvent apparaître également, soit au décours de maladie myéloproliférative ou auto-immune, soit associés à des anomalies du collagène, à des arthrites rhumatoïdes, à la prise de certains médicaments, soit dans

la période du post-partum, soit encore sans aucun désordre simultané (GREEN : 524, FEINSTEIN et RAPAPORT : 525); on peut parler alors d'hémophilie A acquise. Cette maladie n'est pas si rare que l'on a cru pendant longtemps puisque GREEN et LECHNER (526) ont pu établir une statistique à partir de 215 cas publiés et que, au cours d'une recherche systématique chez 6000 malades, DURAN-SUAREZ et al. (527) ont mis en évidence 19 cas d'inhibiteurs anti-VIII:C dont 2 seulement, à vrai dire, étaient associés à un syndrome hémorragique. DURAN-SUAREZ a tout récemment confirmé ce résultat en mettant en évidence 2 inhibiteurs anti-VIII:C dans une population de 400 donneurs de sang (528).

2) Propriétés

a) action sur le F VIII

Les anticorps homologues agissent principalement sur le facteur VIII par leur activité anticoagulante (anti-VIII:C) mais peuvent également avoir une action sur d'autres sites du FVIII que celui responsable de son activité coagulante et former des complexes anti-VIII/F VIII.

α. Activité anti-VIII:C

L'activité anticoagulante, neutralisant l'activité VIII:C, des anticorps homologues est leur propriété la plus connue. Cette activité qui se traduit, lors de l'incubation de ces anticorps avec du plasma normal, par une diminution progressive de l'activité VIII:C du mélange peut être d'ailleurs dosée et s'exprime généralement maintenant en unités Bethesda. BIGGS et BIDWELL (529) ont été les premiers à étudier la cinétique de réaction de ces anticorps et à montrer, dans 6 cas, qu'elle est de deuxième ordre et qu'il existe donc une relation linéaire entre le logarithme du taux de VIII:C résiduel et la concentration en anticorps. Néanmoins, BIGGS et al. se fondant sur l'étude de l'effet anticoagulant de plus nombreux plasmas d'hémophiles et d'inhibiteurs spontanés distinguent plus tard deux types d'anticorps: ceux (type I) qui, ayant un type d'action de deuxième ordre (530), confirment les résultats antérieurs (529) et ceux (type II) qui se rencontrent chez d'autres hémophiles et dans tous les cas d'hémophilie A acquise qu'ils ont étudiés, et se différencient par une réaction

complexe, biphasique (531) avec d'abord disparition rapide du VIII:C, puis diminution lente de cette activité, qui serait due à la persistance de l'activité coagulante du complexe formé entre le VIII et certains des anticorps homologues (BIGGS et al. : 531) dans des conditions où les anticorps sont encore en excès (KERNOFF : 532). Pour ALLAIN et FROMMEL (533), il existe une relation entre l'origine (humaine, porcine, bovine) des fractions antihémophiliques reçues par les hémophiles qui ont développé un inhibiteur et le type de cinétique vis-à-vis de VIII humain, porcin ou bovin de ces inhibiteurs. Enfin, ALLAIN et al. (534) distinguent, parmi 17 inhibiteurs spontanés étudiés, 2 groupes : 6 d'entre eux ont une cinétique de deuxième ordre, sont facilement saturables et ressemblent donc à la cinétique des anticorps d'hémophiles vis-à-vis du VIII humain ; les autres, dont le titre est généralement faible, ont une réaction biphasique et, comme les anticorps d'hémophiles en présence de VIII porcin ou bovin, ne sont pas saturables.

Cependant, quelque soit la cinétique d'action des anticorps, leur activité anticoagulante traduit la formation d'un complexe anticorps/VIII:C qui, cependant, n'a pas de caractère précipitant soit parce qu'il n'est pas stable, soit parce que l'anticorps est univalent, ou encore parce qu'il n'existe qu'un site de fixation de cet anticorps par molécule support du VIII:C (HOYER : 535).

B. Formation de complexe anticorps/F VIII

L'action des anticorps homologues sur du matériel dépourvu d'activité coagulante VIII:C peut se mettre en évidence par un test fondé sur la mesure du titre d'anticoagulant résiduel après incubation préalable des anticorps et de l'antigène. Ce test, mis au point dès 1963 par GOUEMAND et al. (536) permet à DENSON et al. (537) de distinguer 2 types d'hémophiles A. Ceux dont le plasma contient, tout comme le sérum normal, un antigène neutralisant les anticorps homologues et qui sont appelés hémophiles A+ ou CRM+ ("cross reacting material"), et les autres, dont le plasma est incapable de neutraliser les inhibiteurs homologues : HA- ou CRM-. Ces résultats, confirmés par d'autres auteurs, dépendent cependant du titre de l'inhibiteur utilisé et de la durée de l'incubation (BIGGS : 538).

Grâce à l'isolement des anticorps spécifiques capables d'interagir avec l'antigène associé à l'activité coagulante du facteur VIII présent dans le plasma normal (VIII:CAg), plusieurs équipes (PEAKE et BLOOM : 539, LAZARCHICK et HOYER : 540, REISNER et al. : 541, HOLMBERG et al. : 542, MULLER et al. : 543, GIRMA et al. : 544) peuvent maintenant doser, par des techniques immuno-radiologiques (cf p.96), cet antigène appelé VIII:CAg. Les résultats, bien que quelquefois discordants selon la source d'anticorps monospécifiques (542), montrent que le plasma de la plupart des hémophiles A majeurs ne renferme pas de VIIIC:Ag, que celui des vWD a un taux de VIIIC:Ag voisin de son activité VIII:C et que le sérum présente une concentration en VIIIC:Ag subnormale.

Néanmoins, il est à l'heure actuelle difficile de faire une relation entre le taux de VIIIC:Ag d'un plasma d'hémophile et son comportement dans le test de neutralisation des anti-VIII:C homologues.

Si LAVERGNE et al. (545) viennent de démontrer, par des techniques autoradiographiques, que les anticorps de deux hémophiles avec anticoagulant anti-VIII:C sont capables de précipiter en présence de plasma normal, de sérum, de cryoprécipité, de F VIII/vWf et de plasma d'HA+ alors qu'ils ne donnent aucun arc de précipitation avec du plasma d'hémophile A-, on ne sait cependant pas si tous les anticorps homologues, d'hémophiles et spontanés, sont précipitants. Cependant, le fait que certains de ces anticorps puissent être utilisés dans les dosages immuno-radiométriques de type "sandwich" du VIIIC:Ag, montre que dans ces cas, chaque molécule de VIIIC:Ag peut se lier à, au moins, deux molécules d'anti-VIIIC:Ag. Il faut noter en outre que plusieurs travaux récents (GAWRYL et HOYER : (546) et HELLINGS et al. (547)) viennent de montrer qu'il existe des anticorps homologues neutralisants le VIII:C incapables de se lier sur le F VIII sur les mêmes sites, appelés VIII:CAg, que ceux reconnus par d'autres anticorps homologues neutralisants permettant de doser le VIII:CAg. Il semble donc que, même si l'on excepte les auto-anticorps plus complexes car pouvant être de type I et II, les anticorps homologues sont hétérogènes et qu'ils peuvent être dirigés contre divers épitopes du F VIII, plus ou moins proches du site nécessaire pour exprimer l'activité VIII:C.

b) action sur le F vWf

La question de savoir si les anticorps anti-VIII:C homologues sont également capables de réagir avec le F vWf a été, pendant une époque, débattue. Un certain nombre de résultats ont été en faveur de cette action mais d'autres, plus récents, bien souvent semblent permettre de l'exclure.

α. Résultats en faveur d'une action

BOWIE et OWEN (546) rapportent, dès 1973, l'observation de 4 malades ayant un inhibiteur acquis du VIII:C dont deux d'entre eux ont une rétention des plaquettes sur billes de verre diminuée. Peu après, KOUTTS et al. (547) étudient la plupart des activités liées au complexe VIII/vWf chez 6 malades avec anti-VIII:C (1 cas de lupus et 5 HA): l'adhésivité des plaquettes aux billes de verre est diminuée chez 3 des hémophiles étudiés, normale dans le cas d'inhibiteur spontané; le taux de VIII R:Ag est normal, voire augmenté chez 1 des hémophiles (dont l'adhésivité n'a pas été étudiée); le VIII R:RCo est diminué chez 3 des hémophiles. La diminution nette du taux de VIII R:RCo et de VIII R:Ag dans le sérum d'hémophiles A avec inhibiteur est confirmée dans 5 cas sur 9 étudiés par BALLARD et al. (548).

Plusieurs publications font état, non seulement d'une diminution du F vWf des malades avec anti-VIII:C, mais également de la présence dans leur plasma, et apparemment surtout dans leur sérum, d'anticorps capables d'inhiber l'agrégation à la ristocétine de PRP normaux. Selon THOMSON et al. (549), seuls les hémophiles ayant un anticoagulant titrant plus de 30 U/ml inhibent le VIII R:RCo mais, cependant, leurs résultats montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre le titre exact d'anti-VIII:C et le degré d'inhibition du VIII R:RCo; ceci est d'ailleurs en accord avec KOUTTS et al. (547).

β. Résultats en contradiction

WEISS et al. (550) n'arrivent pas à inhiber la correction de l'agrégation à la ristocétine d'un PRP de vWD par un cryoprécipité,

en préincubant ce dernier avec des anticorps homologues. HOUGIE et SARGEANT (551), en faisant agir une anti-globuline humaine sur un cryoprécipité préincubé avec des anticorps homologues, précipitent toute l'activité coagulante VIII:C mais pas le VIII R:Ag. BOUMA et al. (552) montrent que les anticorps homologues n'inhibent pas la rétention plaquettaire sur billes de verre d'un sang normal, MEYER et al. (553) qu'ils n'inhibent pas l'agrégation à la ristocétine d'un PRP normal. ZIMMERMAN et EDGINGTON (554) montrent que des billes couplées à des anticorps homologues anti-VIII:C diminuent de 58 p.100 l'activité VIII:C d'un plasma normal sans diminuer son taux de VIII R:Ag. LANE et al. (555), dans une expérimentation similaire avec du F VIII purifié à la place du plasma, montrent qu'il y a une diminution de 45 à 81 p.100 de VIII:C et de 0 à 33 p.100 du VIII R:Ag mais que 95 p.100 des protéines fixées aux anticorps sont formées de sous-unités de MM faible (30000 et 62000) semblables à celles obtenues avec la partie LMW du complexe F VIII/vwf. LAZARCHICK et HOYER (556) et LAVERGNE et al. (557) prouvent qu'il existe un complexe stable entre le F VIII et les anti-VIII homologues, ils mettent au point la purification des anticorps monospécifiques anti-VIII:CAg qui va permettre à diverses équipes de doser le VIII:CAg et de montrer que la plupart des plasmas hémophiles A majeurs, bien qu'ayant un taux normal de VIII R:Ag, sont incapables de fixer les anticorps homologues qu'ils soient d'HA ou spontanés.

Pour concilier ces deux séries de résultats contradictoires on peut imaginer les hypothèses suivantes: Il pourrait y avoir un encombrement stérique au niveau des sites actifs du F vwf, occasionné par la fixation des anticorps dirigés spécifiquement contre le F VIII, qui expliquerait l'action des anticorps homologues sur les activités liées au F vwf. La diminution sérique du VIII R:Ag et du VIII R:RCo chez les malades avec anticorps homologues spontanés ou d'hémophiles A+, pourrait être due à un changement de conformation des molécules de F VIII/vwf consécutif à la fixation des anticorps qui résulterait en une adsorption augmentée sur le caillot de fibrine.

3) Nature

Sauf dans de rares cas où les anticorps sont des IgM (CASTALDI et PENNI : 558, Mc KELVEY et KWAAN : 559) ou un mélange

IgM, Ig G (LUSHER et al. : 560, ANDERSEN et TROUP : 561, KAVANAH et al. : 562), l'effet inhibiteur est du à l'activité anticorps de certaines IgG. La nature exacte des chaînes légères et lourdes de ces anticorps n'a été étudiée que dans un nombre de cas restreint, car la caractérisation de l'effet anticoagulant devient difficile si le titre d'anti-VIII:C est faible dans le plasma de départ, lorsqu'on doit analyser des fractions d'immunoglobulines purifiées par chromatographie, donc diluées. Il semble, néanmoins, que les anticorps isolés de plasmas d'hémophiles soient de nature moins hétérogènes que les anticorps dits "spontanés".

a) chez les hémophiles

Les premiers travaux sur les anticorps anti-VIII:C développés par certains hémophiles A semblent en faveur de leur origine monoclonale car ils ont un seul type de chaînes légères, généralement Kappa (SHAPIRO : 563, ROBBY et al. : 564) et de chaînes lourdes presque exclusivement Ig4 (564, ANDERSEN et TERRY : 565). Néanmoins, des études ultérieures effectuées sur des immunoglobulines purifiées montrent qu'il existe une certaine hétérogénéité qui fait penser plutôt à une origine oligoclonale (LAVERGNE et al. : 566, KAVANAH et al. : 562) de ces anticorps. En effet, si on regroupe les résultats de SHAPIRO (567), LAVERGNE et al. (566), HULTIN et al. (568), ALLAIN et al. (569) et KAVANAH et al. (562), on s'aperçoit que, sur 25 Ig G d'hémophiles typées, 17 sont de type kappa, 4 kappa + lambda, et 4 lambda uniquement alors que pour les chaînes lourdes : 10 sont des Ig4, 5 un mélange d'Ig4 et d'Ig1 (quelquefois à l'état de trace), 6 : Ig4 + Ig3, 1 : Ig4 + Ig2, et 3 : Ig3.

b) chez les "non hémophiles"

Employant les mêmes techniques et les mêmes antisérums pour caractériser 9 anticorps d'hémophiles et 9 anticorps spontanés, ALLAIN et al. (569) ont noté la plus grande hétérogénéité des anticorps acquis chez les personnes ayant une défaillance de leur système immunologique (anticorps non consécutifs à un phénomène d'immunisation). En fait, si on cumule les résultats de ces auteurs et ceux, antérieurs, qu'ils ont rapportés dans leur discussion on peut dire que, pour ce qui

est des chaînes légères, sur 31 cas étudiés, 16 sont de type kappa, 5 de type lambda, 10 un mélange kappa et lambda, alors que pour les sous-classes de chaînes lourdes, sur 15 cas : 7 sont des Ig4, 6 : des Ig4 + Ig1, 1 : Ig4 + Ig3 et 1 : Ig3.

B - LES ANTICORPS HETEROLOGUES

Des préparations de facteur VIII/vwf, on l'a vu précédemment (p.39), peuvent induire chez l'animal des anticorps hétérologues dirigés contre le F VIII. Il est possible d'obtenir ainsi des anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-VIII:C. SOLA et al. (570) et FASS et al. (571) ont montré qu'en restimulant des souris, déjà immunisées avec du F VIII/vwf porcin, avec une préparation de F VIII ils peuvent obtenir, après fusion, 3 clones d'hybrides capables de fixer le F VIII, dont deux seulement inhibent le VIII:C.

Cependant, c'est le F VIII purifié qui sera certainement l'immunogène le meilleur pour obtenir des anticorps anti-F VIII. De telles préparations de F VIII, obtenues après dissociation du F vwf du complexe F VIII/vwf, ont été utilisées pour préparer soit des anticorps polyclonaux, soit des anticorps monoclonaux.

1) Anticorps polyclonaux

Les premiers essais de préparation d'anticorps hétérologues spécifiques du F VIII ont été décevants car il s'est avéré que les animaux immunisés avec des fractions LMW (fraction douée d'activité VIII:C retardée lors du tamisage moléculaire du F VIII/vwf en milieu de force ionique élevée) étaient source d'antisérum :

- neutralisant l'activité VIII:C du plasma, du complexe F VIII/vwf mais pas celle du F VIII dissocié (RICK et HOYER : 572, RATNOFF et al. : 573),

- neutralisant le VIII:C, le VIII R:RCO et précipitant avec le VIII R:Ag (MULLER et al. : 574) donc dirigés à la fois contre le F VIII et le F vwf.

KOUTTS et al. (575), ont montré que, néanmoins, on peut obtenir des anticorps monospécifiques du F VIII à partir de ces antisérums en les faisant réagir préalablement avec un excès de F vwf qui

permet d'éliminer les anticorps anti-VIII R:Ag et anti-VIII R:RCO dirigés contre le F vwf contaminant probablement les préparations de F VIII. Les anticorps anti-F vwf indésirables peuvent être également éliminés par épuisement des antisérums avec du cryoprécipité d'hémophile A (MUNTZ et EKERT : 576) ou du HMW insolubilisé (TRAN et al. : 577). Dans tous les cas l'activité anti-VIII:C n'est pas affaiblie lors de ces traitements, elle augmente même parfois, ce qui est en accord avec l'hypothèse de BOUMA et al. (578) qui pensent que certains anticorps anti-FvWf peuvent gêner l'accessibilité aux sites VIII:C, des anticorps anti-F VIII.

Récemment FULCHER et ZIMMERMAN (579) ont immunisé un émeu avec une préparation de F VIII purifiée 164000 fois. Après élimination des anticorps anti-fibrinogène et anti-fibronectine par immunoadsorption, l'antisérum obtenu paraît monospécifique : il a une activité neutralisante anti-VIII:C (600 à 900 U Bethesda/ml) et, de plus, il précipite en présence du F VIII purifié de plasma normal mais ne reconnaît aucun déterminant de plasmas d'hémophiles A majeurs ou de vWD sévères.

2) Anticorps monoclonaux

Récemment MULLER et al. (580) ont travaillé à la préparation d'anticorps monoclonaux à partir de rates de souris immunisées avec du F VIII humain. Après fusion, une activité anti-VIII:C est détectée dans 12/32 des surnageants ; le clonage aboutit à des anticorps de titre anti-VIII:C très élevé (5000 à 10 000 U Bethesda/ml) qui neutralisent l'activité VIII:C du plasma, mais aussi du LMW, en empêchant l'activation du facteur VIII. Ces anticorps, non précipitant, se fixent au VIII:C_{Ag} du plasma et du F VIII purifié mais ne réagissent pas, contrairement aux anticorps homologues, avec le sérum. Il semble donc qu'ils reconnaissent le F VIII natif mais pas le F VIII activé puis inactivé par la thrombine.

IV - DOSAGES DU F VIII

Il existe deux sortes de techniques de dosage du facteur VIII, les unes sont fonctionnelles et mesurent l'activité coagulante VIII:C grâce à des dosages fondés sur le mécanisme de la voie endogène de la coagulation, les autres sont immunologiques, elles permettent de détecter l'entité moléculaire antigénique, support de l'activité VIII:C, appelée VIII:Ag.

A - DOSAGES DE L'ACTIVITE VIII:C

Il existe deux types de techniques permettant de doser l'activité VIII:C d'un plasma, ou d'une préparation, en la comparant à celle d'un mélange de plasmas témoins renfermant, par définition 1U de VIII:C/ml. Elles sont fondées sur un principe différent et, comme elles se différencient par le fait qu'on les réalise en 1 seule ou 2 étapes, on les appelle technique en 1 temps ou 2 temps.

1) Technique en 1 temps

Cette technique a été publiée en 1953 par SOULIER et LARRIEU (581) et LANGDELL et al. (582). Son principe est le suivant : on mesure les temps de coagulation d'un mélange contenant du plasma déficitaire en VIII:C (source de tous les facteurs plasmatiques de coagulation de la voie endogène à l'exception du VIII:C qui sera apporté uniquement par les dilutions du plasma témoin ou de l'échantillon à tester), des phospholipides (source de F3p), une substance activatrice des facteurs contact (en général le Kaolin), et différentes dilutions soit du plasma de référence, soit de l'échantillon à analyser. Les temps de coagulation obtenus avec les dilutions en série du plasma témoin seront d'autant plus courts que les dilutions seront faibles, donc riches en VIII:C. Ces temps sont alignés sur une droite si on les exprime (ou leur logarithme) en fonction du logarithme des taux de VIII:C. Les temps obtenus avec les dilutions de l'échantillon doivent se situer sur une droite parallèle à cette droite d'étalonnage et permettent d'exprimer le taux de VIII:C en fonction du plasma de référence.

2) Technique en 2 temps

Cette technique mise au point par BIGGS et al. (583) se réalise en 2 étapes. Lors d'une première étape, on effectue des mélanges constitués de tous les facteurs de coagulation de la voie endogène, sauf le VIII, le II et le fibrinogène, et des dilutions soit du plasma de référence, soit de l'échantillon à doser. Ces dilutions apportant le VIII:C, durant cette première étape va pouvoir se générer, dans le mélange, du facteur Xa ; c'est la quantité de Xa formée au bout d'un temps d'incubation défini préalablement comme étant nécessaire et suffisant pour activer le maximum de facteur X, qui est proportionnelle à la quantité de VIII apportée par les dilutions. La quantité de Xa sera mesurée dans la deuxième étape. Le moyen le plus fréquemment utilisé pour doser le Xa est celui préconisé dans la technique initiale de BIGGS et al. (583) qui consiste à déterminer le temps de coagulation, en présence d'une aliquote du mélange de la première étape, d'un plasma source de II et de fibrinogène, et, dans ce cas, le log des temps de coagulation est proportionnel au taux de VIII:C. Mais il est possible également de doser le Xa par des techniques chromogéniques (SEGHATCHIAN et MILLER-ANDERSON : 584) ou fluorogéniques (MITCHELL et al. : 585).

3) Problèmes rencontrés

Les dosages fonctionnels du facteur VIII reposant sur son activité coagulante sont limités du fait qu'ils ne permettent pas de doser le F VIII inactivé par la thrombine, tel qu'il se trouve dans le sérum par exemple, et qu'ils peuvent donner des résultats par excès, du moins par la technique en 1 temps, lorsque le F VIII existe sous une forme activée par des traces de thrombine ou de Xa. Divers articles ont été consacrés aux résultats donnés par les techniques en 1 et 2 temps (KIRKWOOD et BARROWCLIFFE : 586, NILSSON et al. : 587, ALLAIN et al. : 588, BEESER : 589) aussi ne reviendrons nous pas sur ce sujet ; chacune des techniques a ses adeptes : le 1 temps est plus facile à mettre en oeuvre, le 2 temps est plus reproductible. La technique en 1 temps requiert un plasma dépourvu de VIII:C et c'est là une de ses limites : tous les plasmas d'hémophiles A majeur (VIII:C < 0.01U/ml), déjà en quantité limitée, ne constituent pas un réactif convenable. Il existe néanmoins actuellement la possibilité de préparer du plasma artificiellement dépourvu de VIII:C à partir de plasma normal prélevé sur EDTA ou immuno-adsorbé sur anticorps anti-VIII/vwf

(CHANTARANGKUL et al. : 590, FURLAN et al. : 591, OFOSU et al. : 592). La technique en 2 temps, plus longue à réaliser, nécessite la préparation de 2 réactifs : un sérum source de IX, X, XI et XII et une préparation de facteur V semi-purifié. Les plasmas de référence et à analyser, source de VIII, sont préalablement adsorbés sur hydroxyde d'alumine afin d'éliminer les facteurs activés pouvant interférer dans le dosage, et ce traitement est source d'erreur car, si le F VIII à doser se trouve dans un environnement protéique différent du plasma, il peut être adsorbé, lui aussi, en partie, sur l'alumine (SEGHATCHIAN et MACKIE : 593 et KEMBALL-COOK et al. : 594).

Enfin, il existe des problèmes communs aux deux techniques : d'abord celui du plasma de référence : les mélanges de plusieurs plasmas de témoins n'ont pas toujours la même activité coagulante car les taux normaux de VIII:C peuvent varier entre 0.4 et 2 U/ml et il est erroné de leur donner arbitrairement la valeur de 1 U. F VIII:C/ml ; aussi de plus en plus, on préconise de doser ces mélanges de plasmas par rapport à un standard international qui sert de référence. Ensuite, la source de substitut de facteur 3 plaquettaire : divers réactifs phospholipidiques ont été récemment étudiés par BARROWCLIFFE et GRAY (595) ; ils n'ont pas tous la même sensibilité vis à vis du VIII:C.

B - DOSAGES IMMUNOLOGIQUES DU F VIII

La première mise en évidence immunologique de la molécule support du VIII:C date de 1963 quand GOUDEMANT et al. (596) ont montré la présence, dans le plasma de certains hémophiles, d'une molécule inactivée capable de neutraliser l'activité anticoagulante anti-VIII:C d'anticorps homologues. La technique de dosage qui découle de ce test appelé "neutralisation de l'anticoagulant", a permis de différencier environ 10 p.100 des hémophiles A majeurs dits CRM+ ou A+, neutralisant l'anticoagulant donc possédant le "Cross Reacting Material", de la majorité des hémophiles dits A- ou CRM- (HOYER et BRECKENRIDGE : 597, DENSON et al. : 598, GOUDEMANT et al. : 599). Néanmoins, les résultats, ainsi que l'a montré BIGGS (600), dépendent de la durée d'incubation du plasma à analyser avec les anti-VIII:C et, selon ZIMMERMAN et al. (601) qui ont utilisé une technique d'immunoabsorption, tous les hémophiles seraient CRM+. En 1978, PEAKE et BLOOM (602) sont les premiers à présenter une technique immunoradiométrique de dosage et proposent le terme de VIII:C_{Ag} pour désigner l'antigène reconnu par les anticorps homologues. Le taux de VIII:C_{Ag} est proportion-

nel au taux de VIII:C dans la plupart des plasmas, normaux et de vWD, et diminué ou absent des plasmas d'hémophiles majeurs. Depuis cette date, plusieurs équipes ont présenté d'autres techniques par RIA ou IRMA, en phase liquide ou solide, avec des anticorps isolés d'hémophiles ou de malades ayant acquis spontanément un anti-VIII:C, avec les IgG ou les fragments Fab des anticorps de ces malades, (LAZAR-CHICK et HOYER : 603, PEAKE et al. : 604, HOLMBERG et al. : 605, REISNER et al. : 606, MULLER et al. : 607) et des comparaisons sont déjà faites entre les résultats de diverses techniques et obtenus avec divers anticorps (NILSSON et al. : 608, GIRMA et al. : 609, ROTBLAT et TUDDENHAM : 610, LJUNG et HOLMBERG : 611). Toutes ces techniques nécessitent l'isolement, à partir des IgG purifiées des sérums de malades ayant une activité anti-VIII:C d'au moins 100 U.Bethesda/ml, des anticorps anti-VIII:C représentant, en moyenne, 1p.100 de ces IgG. Il est probable que bientôt l'utilisation d'anticorps hétérologues anti-VIII:C et en particulier d'anticorps monoclonaux facilitera cette étape d'isolement qui reste, bien que différentes techniques en phase liquide et solide aient été proposées, encore délicate.

Récemment, Mc LELLAN et al. (612) ont proposé une technique d'inhibition de coagulation en gel d'agarose qui a l'avantage d'être simple; elle est réalisée avec un sérum anti-VIII:C de titre faible (< 100 U.Bethesda) mais ne réussit cependant pas avec tous les sérums de malade utilisés. THOMAS et al. (613) ont, eux, mis au point une technique immunoradiométrique à double anticorps qui n'est applicable qu'au dosage du VIII:C:Ag de plasma car le F VIII, fixé dans un premier temps à des anticorps anti-VIII:C homologues insolubilisés, est révélé par un anti-VIII R:Ag hétérologue marqué à l'iode 125 ; le VIII:C:Ag n'est donc dosé que s'il est impliqué dans le complexe F VIII/vwf.

V. - PATHOLOGIE LIEE AU F VIII

Il existe plusieurs formes d'anomalies hémorragiques congénitales caractérisées par un déficit en F VIII:C. Certaines formes sont très rares, elles ne sont pas nécessairement dues à une anomalie du F VIII mais leur étude peut apporter des éléments précieux concernant le mécanisme d'action et de régulation de ce facteur. Néanmoins, la majorité des hémophiles appartiennent à la forme classique d'hémophilie A qui est la plus fréquente des maladies hémorragiques congénitales puisqu'elle affecte environ 1 sujet sur 10000.

A - L'HEMOPHILIE A CLASSIQUE

Cette maladie, liée à une anomalie de chromosome X, présente deux types :

- les hémophiles A majeurs ayant un taux de VIII:C inférieur à 0,01U/ml, un syndrome hémorragique en général sévère, et chez lesquels apparait fréquemment (≈ 10 p.100) des anticorps de type anti-VIII:C (cf p.84).

- les hémophiles A, dits mineurs ou modérés, ayant un taux de VIII:C compris entre 0,01 et 0,35 U/ml, souvent moins atteints cliniquement et qui ne développent, en général, pas d'anticoagulant.

La forme mineure et majeure de l'hémophilie A est un caractère génétique, il apparait que le déficit modéré ou complet en VIII:C est consécutif à une anomalie quantitative et/ou à une anomalie qualitative du facteur VIII. En effet, les dosages de VIII:C:Ag ont révélé une hétérogénéité parmi le groupe des hémophiles (LAZARCHICK et HOYER : 614, PEAKE et al. : 615, HOLMBERG et al. : 616, MULLER et al. : 617, REISNER et al. : 618, GIRMA et al. : 619, ROTBLAT et TUDDENHAM : 620, LJUNG et HOLMBERG : 621). On distingue :

- les hémophiles A majeurs qui n'ont pas de VIII:C:Ag ; il s'agit de la majorité des hémophiles A majeurs, le déficit complet en VIII:C est dû probablement à une absence de synthèse du F VIII.

- les hémophiles A majeurs qui ont un taux de VIII:C:Ag compris entre 0,01 et 0,30 U/ml ; chez la plupart d'entre eux la synthèse du F VIII est sans doute très diminuée mais la présence de VIII:C:Ag, alors que le VIII:C est indétectable, fait penser que le VIII:C:Ag synthétisé est, de plus, anormal et pourrait avoir perdu

une partie des déterminants antigéniques reconnus par les anticorps anti-VIII:C homologues.

- les hémophiles mineurs qui ont des taux diminués de VIII:CAg avec, en général, un taux de VIII:CAg légèrement plus élevé que le taux de VIII:C.

- les hémophiles mineurs qui ont un taux de VIII:CAg normal. Ils constituent une minorité d'hémophiles chez qui l'anomalie du F VIII semble uniquement qualitative et non liée à un défaut de synthèse.

B - AUTRES FORMES D'HEMOPHILIE A

A côté de la forme classique d'hémophilie A, on distingue plusieurs formes, très rares, dues également à des anomalies congénitales :

- l'hémophilie A autosomale qui se transmet selon le mode dominant (GRAHAM et al. : 622),

- l'hémophilie de type "Heckathorn" décrite par RATNOFF et LEWIS (623), liée au sexe, et se caractérisant par une grande variabilité des taux de VIII:C chez le même individu.

- le déficit associé en VII et en VIII (GIROLAMI et al.: 624), autosomal dominant, pourrait en fait se classer en deux types: l'un serait dû à une association d'anomalies de synthèse au niveau des gènes contrôlant le VII et le VIII, l'autre serait consécutif à une seule anomalie d'un gène contrôlant peut-être l'action de ces deux facteurs (GIROLAMI et al. : 625).

- le déficit associé en VIII et en V, rapporté pour la première fois par JONES et al. (626), apparemment transmis selon le mode autosomal récessif. Ce déficit peut être dû, ainsi que l'ont montré récemment MARLAR et GRIFFIN (627), à un déficit de l'inhibiteur de la protéine C. Normalement cet inhibiteur empêche la protéine C activée par la thrombine et la thrombomoduline de s'opposer à l'activité coagulante du VIII et du V activés par ce même enzyme. L'étude de cette anomalie, très rare, apporte des éléments précieux concernant le mécanisme d'action du F VIII et c'est là un exemple récent de l'apport de l'étude des cas pathologiques dans le domaine de la physiologie.

VI - RELATIONS STRUCTURE-FONCTION DU F VIII

L'étude des relations structure-fonction du F VIII doit théoriquement pouvoir bénéficier des renseignements acquis sur les molécules de F VIII:CAg non fonctionnelles, telles qu'elles existent chez certains hémophiles A classiques. Cependant, connaissant les difficultés rencontrées pour purifier le F VIII pur à partir de plasma normal (cf p. 81), il n'est pas étonnant de constater qu'on a encore bien peu d'éléments sur le VIII:CAg anormal présent dans le plasma de certains hémophiles A. C'est donc surtout en étudiant le devenir de l'activité coagulante VIII:C d'un plasma, ou d'une fraction purifiée F VIII/vWf, en présence de divers agents chimiques ou enzymatiques, qu'on a essayé de discerner les structures moléculaires impliquées dans l'activité coagulante du F VIII.

BU
LILLE

Des travaux antérieurs à 1976 ont permis de penser que la partie glycanne du F VIII intervient dans son activité biologique. En effet, AUSTEN et BIDWELL (628) ont montré d'abord que les enzymes glycolytiques de *Trichomonas foetus* induisent une diminution du VIII:C qui peut-être prévenue par addition de glycoprotéines ou de certains monosaccharides. MELO-PERISSE et al. (629) disent que l'activité VIII:C de concentrés de F VIII/vWf bovin diminue au cours de l'oxydation par le périodate de sodium alors que KAELIN (630) constate, lui, une augmentation du VIII:C, dosé par la technique en 2 temps, lorsqu'il traite du plasma ou du concentré de F VIII/vWf humain par ce même agent oxydant. Cependant, des travaux plus récents semblent nier le rôle des glycannes : GRALNICK et al. (631) constatent notamment que les neuraminidases et les galactose-oxidases n'ont aucun effet sur l'activité VIII:C de F VIII/vWf humain purifié, et, on peut se demander si les résultats antérieurs (628-630) ne peuvent être attribués à l'utilisation d'enzymes non purifiés ou à l'action du périodate au niveau de la copule protéique du F VIII.

En 1970, AUSTEN (632) a souligné l'importance des groupements thiols dans l'activité VIII:C : le F VIII/vWf est inactivé par le para-chloromercuri-benzoate de sodium mais cette inactivation est réversible en présence de cystéine. Cependant, une réduction légère du F VIII/vWf par le mercapto-éthanol 0,05 M n'entraîne pas de modification de l'activité VIII:C (COUNTS et al. : 633). Il existe également

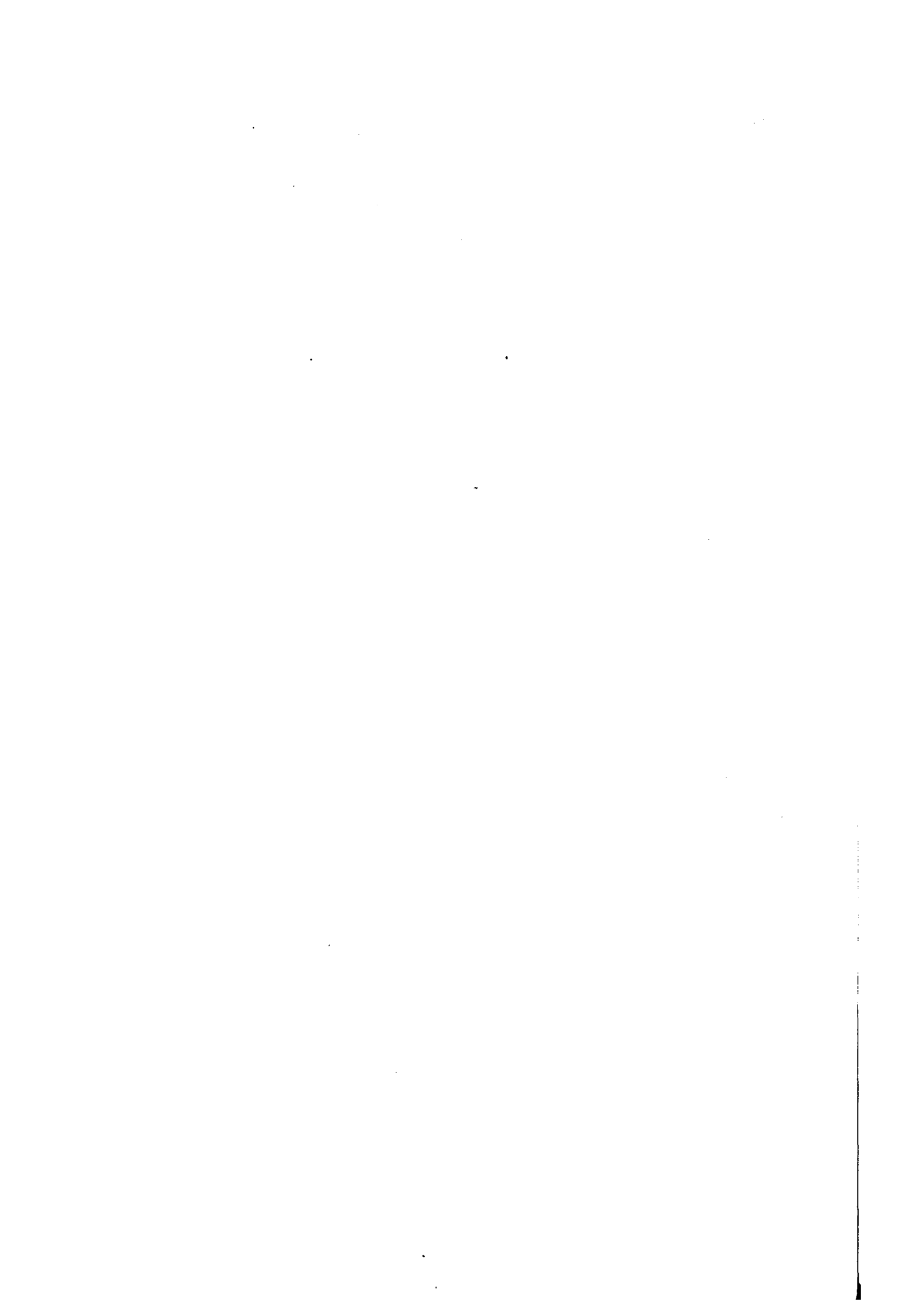
des controverses en ce qui concerne le rôle des groupements lysine dans l'activité VIII:C. En effet, THUY et al. (634) abolissent complètement l'activité VIII:C du F VIII/vwf bovin en succinylant 91 p.100 de ses résidus de lysine alors que FURLAN et al. (635) ne constatent aucune perte de VIII:C après blocage de 40 p.100 des résidus de lysine par l'acetamidate d'éthyl. La copule protéique du F VIII doit cependant avoir un rôle primordial pour son activité VIII:C car il est maintenant généralement admis (cf p. 9), sauf par NEAL et CHAVIN (636) et VUKOVICH et al. (637-638), que la thrombine ou le Xa sont nécessaires pour "activer" le facteur VIII. SWITZER et Mc KEE (639) ont montré que la thrombine se complexe au F VIII/vwf pour activer le F VIII et que l'activation est inhibée par les inhibiteurs des sérine-protéases et est optimale dans des rapports stochiométriques thrombine/F VIII/vwf.

Il faut noter que, récemment, ROCK et al. (640) ont annoncé avoir isolé et étudié le F VIII anormal de 4 hémophiles A. Ils rapportent les résultats de l'étude par "disc-électrophorésis", électrofocalisation et de la composition centesimale en sucres et les comparent à ceux obtenus à partir de F VIII normal. Il apparaît que les anomalies sont hétérogènes et complexes et qu'il est difficile d'en déduire quelque conclusion que ce soit concernant, soit le rôle des glycanes soit le rôle de la protéine du VIII:CAg dans son activité VIII:C.

Enfin, comme la composition biochimique du F VIII n'est pas encore connue, on ne peut écarter la possibilité qu'il soit de nature lipo-glyco-protéinique et ne pas envisager l'hypothèse de l'importance des lipides dans la fonction de cette molécule. Cette hypothèse rejoindrait d'ailleurs les résultats de HERSHGOLD et al. (641) montrant que la phospholipase D augmente l'activité coagulante du F VIII/vwf alors que la phospholipase C la détruit. Il semble néanmoins que ce soit des lipides étrangers à la molécule de F VIII, en particulier les phospholipides, qui jouent un rôle dans la fonction coagulante de ce facteur (HEMKER et al. : 642, BARROWCLIFFE et GRAY : 643, BARROWCLIFFE et al. : 644). En effet, on conçoit bien à la suite des résultats de ANDERSSON et BROWN (645) qui ont montré que le facteur VIII, libéré du F vwf par action de la thrombine, se fixe à des vésicules de phosphatidyl-sérine/phosphatidyl-ethanolamine, que le F VIIIa n'est présent que de façon transitoire dans le plasma car il se fixe à la surface des plaquettes "activées".

elles aussi par les premières traces de thrombine.

En définitive, il subsiste encore de nombreuses inconnues concernant le mécanisme moléculaire d'action du F VIII dans la coagulation mais les recherches actuelles sur la biochimie du facteur VIII semblent apporter les premiers éléments de cette connaissance qui pourrait amener un jour à des améliorations considérables dans le domaine du diagnostic, du traitement et de l'avenir des hémophiles.



TRAVAUX PERSONNELS

Les recherches que nous avons menées depuis 1973 sur le facteur VIII/vWf ont fait l'objet des publications, communications et posters suivants :

PUBLICATIONS :

- 1 - Action des anticorps anti-facteur VIII sur la rétention des plaquettes aux billes de verre :
C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUEMAND.
Pathologie Biologie, 1973, 21 Suppl, 72-75.
- 2 - Dépistage des conductrices de l'hémophilie A par dosage comparatif de l'activité et de l'antigénicité facteur VIII :
A. PARQUET-GERNEZ, C. MAZURIER, M. GOUEMAND.
Pathologie Biologie, 1974, 22 Suppl, 37-42.
- 3 - Contribution à l'isolement et à l'étude de la masse moléculaire du facteur VIII humain :
C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUEMAND, J. MONTREUIL.
Pathologie Biologie, 1975, 23 Suppl, 11-16.
- 4 - Action of insolubilized homologous anti-factor VIII antibodies on factor VIII related antigen :
C. MAZURIER, M. KACEM, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUEMAND.
Thrombosis Research, 1977, 10, 661-667.
- 5 - Dosage de l'antigène lié au facteur VIII par la technique ELISA. Intérêt dans l'étude de la maladie de Willebrand :
C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUEMAND.
Pathologie Biologie, 1977, 25 Suppl, 18-24.

6 - Antigènes HLA et maladie de Willebrand :

J. GOUDEMANT, C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUDEMANT.

Pathologie Biologie, 1977, 25, 241-243.

7 - Etude de l'antigène lié au facteur VIII (VIII R:Ag).

Purification par chromatographie d'immuno-affinité.

C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, B. SAMOR, M. GOUDEMANT, J. MONTREUIL.

Compte-rendus de l'Académie des Sciences Paris, 1979, 288, 1431-1434.

8 - The assay of factor VIII-related antigen by an immuno-enzymatic method :

C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUDEMANT.

Thrombosis and Haemostasis, 1980, 43-1, 71.

9 - Chemical composition of factor VIII.

C. MAZURIER, B. SAMOR, A. PARQUET-GERNEZ, B. FOURNET, M. GOUDEMANT, J. MONTREUIL :

In "Protides of Biological Fluids", 28th Colloquium 1980, edited by Dr H. Peeters, 299-302.

10 - Acquired von Willebrand's syndrome in the course of Waldenström disease :

C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, J. DESCAMPS, F. BAUTERS, M. GOUDEMANT.

Thrombosis and Haemostasis, 1980, 44-3, 115-118.

11 - Blood group A and B activity associated with factor VIII/von Willebrand factor :

C. MAZURIER, B. SAMOR, L. MANNESSIER, A. PARQUET-GERNEZ and M. GOUDEMANT.

Revue Française de Transfusion et immuno-hématologie, 1981, 24-3, 289-298.

12 - Etude d'un concentré thérapeutique de facteur VIII/vWf préparé en circuit clos.

C. MAZURIER, J. MAILLARD, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUDEMANT.

Revue Française de Transfusion et immuno-hématologie, 1982, 25-1, 25-43.

13 - Preliminary results on the carbohydrate moiety of factor VIII/von Willebrand factor (F VIII/vWf).

B. SAMOR, C. MAZURIER, M. GOUDEMANT.

P. DEBEIRE, B. FOURNET, J. MONTREUIL.

Thrombosis Research, 1982, 25-1/2, 81-89.

14 - Structure determination of the major asparagine-linked sugar chain of human factor VIII/von Willebrand factor.

P. DEBEIRE, J. MONTREUIL.

B. SAMOR, C. MAZURIER, M. GOUEMAND.

H. Van HALBEEK, J.F.G. VLIEGENTHART.

F.E.B.S. Letters, sous presse.

COMMUNICATIONS ET POSTERS :

- Action des anticorps anti-facteur VIII sur la rétention des plaquettes aux billes de verre :

C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUEMAND.

Journée du groupe sur l'Hémostase et la Thrombose, PARIS, 1973.

- Dépistage des conductrices de l'hémophilie A :

A. PARQUET-GERNEZ, C. MAZURIER, M. GOUEMAND.

Journée du groupe sur l'Hémostase et la Thrombose, NANCY, Novembre 1973.

- Contribution à l'isolement et à l'étude de la masse moléculaire du facteur VIII humain :

C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUEMAND.

1er Congrès Français d'Hématologie, VITTEL, 24-26 Avril 1975.

- Dosage de l'antigène lié au facteur VIII par la technique ELISA :

C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUEMAND.

Journée du groupe d'études sur l'Hémostase et la Thrombose, PARIS, 18 Décembre 1976.

- Etude quantitative et qualitative de l'antigène lié au facteur VIII dans la maladie de vWD :

C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUEMAND.

3ème Congrès Français d'Hématologie, BRUXELLES, 13-16 Avril 1977.

- Etude physiochimique de l'antigène lié au facteur anti-hémophilique A :

C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, B. SAMOR, M. GOUEMAND.

Journées Biomédicales de Lille, 13 et 14 Octobre 1978.

- Purification de l'antigène lié au facteur VIII :

C. MAZURIER, B. SAMOR, A. PARQUET-GERNEZ, J. MONTREUIL, M. GOUEMAND.

4ème Congrès Français d'Hématologie, STRASBOURG, 25-29 Juin 1979.

- Syndrome de Willebrand acquis au cours d'une maladie de Waldenström :

C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, J. DESCAMPS, M. GOUEMAND.

4ème Congrès Français d'Hématologie, STRASBOURG, 25-29 Juin 1979.

- Contrôle de qualité des fractions antihémophiliques:

M. GOUEMAND, C. MAZURIER, C. MANGIN, A. PARQUET-GERNEZ, B. SAMOR, L. MARTINACHE.

11ème Congrès National de Transfusion Sanguine, STRASBOURG, 25-29 Juin 1979.

- Composition chimique du facteur VIII R:Ag : étude de la copule glycanique :

B. SAMOR, C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ, J. MONTREUIL, M. GOUEMAND.

Réunion du groupe d'études sur l'Hémostase et la Thrombose, PARIS, 10 Novembre 1979.

- Chemical composition of factor VIII related antigen:

C. MAZURIER, B. SAMOR, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUEMAND, J. MONTREUIL.

28ème Colloque Protides of Biological Fluids, BRUXELLES, 5-8 Mai 1980.

- Activité du groupe sanguin A et B associée au facteur

VIII :

C. MAZURIER, B. SAMOR, L. MANNESSIER, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUEMAND.

Réunion de la Société Française de Transfusion, PARIS, 27 Juin 1980.

- In vitro and in vivo characterization of a new human factor VIII concentrate :

C. MAZURIER, M. GOUEMAND.

1ère Conférence Internationale sur l'hémophilie, BONN, 7 Octobre 1980.

- "Cold insoluble globulin" et facteur antihémophilique A dans le plasma humain :

C. MAZURIER, B. SAMOR, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUEMAND.

6ème Congrès international sur la thrombose de la ligue méditerranéenne contre les maladies thrombo-emboliques, MONTE-CARLO, Octobre 1980.

- Dosages immuno-enzymologiques des facteurs VIII et

IX :

A. PARQUET-GERNEZ, C. MAZURIER.

Entretiens de Franconville, Paris 12 Mars 1982.

- The association of F VIII/vWf and fibronectin investigated by radiocrossed-immunoelectrophoresis :

M.J. SEGATCHIAN, I.J. MACKIE, C. MAZURIER.

Br. Soc. of Haemost. and Thromb., Londres 2 Avril 1982.

- Dosage immuno-enzymatique des facteurs VIII R:Ag et

IX:Ag :

J. AMIRAL, J.L. MARTINOLI,

C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ.

3èmes Journées lilloises de biologie clinique, LILLE, 18 Juin 1982.

-Actualités des fractions coagulantes :

M. GOUEMAND, C. MAZURIER, M.P. HENON, A. LEFEVRE, L. MARTINACHE.

XIIème Congrès National de Transfusion Sanguine, SAINT-ETIENNE, 8-10 Juillet 1982.

-Structural studies on carbohydrate moiety of factor VIII/

vWf.

C. MAZURIER, B. SAMOR, M. GOUEMAND,

P. DEBEIRE, B. FOURNET, J. MONTREUIL.

International Congress of Haematology and Blood Transfusion, BUDAPEST, 1-7 Aout 1982.

-The association of F VIII/vWf and fibronectin investigated by radio-crossed immunoelectrophoresis of F VIII clinical concentrates.

M.J. SEGATCHIAN, I.J. MACKIE, C. MAZURIER, M. GOUEMAND.

Symposium on factor VIII/von Willebrand factor, SAN DIEGO, 7-9 Octobre 1982.

- Chemical characterization of the carbohydrate moiety of human F VIII/vWf.

C. MAZURIER, B. SAMOR, P. DEBEIRE, M. GOUEMAND, J. MONTREUIL.

Symposium on factor VIII/von Willebrand factor, SAN DIEGO, 7-9 Octobre 1982.

Comme les connaissances sur le F VIII/vWf ont beaucoup évolué durant nos recherches, nous avons préféré reproduire "in extenso" la plupart des articles publiés en les regroupant selon leur orientation. C'est ainsi que nous envisagerons successivement les articles "d'orientation immunologique" en présentant les publications relatives à :

- l'étude de l'action de divers anticorps sur le F VIII/vWf (article 1 et 4).

- la mise en évidence d'une forme rare d'anomalie du F VIII/vWf, la maladie de vWD acquise (article 10),

- la mise au point et les applications du dosage du VIII R:Ag (articles 2, 5, 8).

d'orientation biochimique qui se rapportent tout d'abord à l'isolement du F VIII/vWf qui a été réalisé en deux étapes :

- obtention de fractions concentrées de F VIII/vWf et son adaptation à la préparation de produits thérapeutiques (article 12),
- purification du F VIII/vWf à partir des fractions concentrées (articles 3 et 7).

Enfin, l'étude biochimique du F VIII/vWf ainsi purifié, pour laquelle nous avons bénéficié tout particulièrement de collaborations, sera abordée sous la forme de 4 articles consacrés à la composition chimique (article 9), à la copule glycanique (articles 13 et 14) et à l'activité de groupe A et B (article 11) de cette molécule.

ETUDE IMMUNOLOGIQUE DU FVIII/vWf

Cette première partie regroupe des articles dits "immunologiques", en ce sens que leur méthodologie est fondée sur l'emploi de divers anticorps, homologues ou hétérologues, dirigés contre le FVIII ou le facteur Willebrand. Dans les deux premiers articles présentés, ces anticorps ont été utilisés afin d'étudier les rapports existants entre le facteur VIII:C et le facteur VIII R:Ag à une époque où on n'avait pas encore toutes les preuves que le facteur VIII R:Ag était une molécule distincte du facteur VIII support du VIII:C, nécessaire à l'activité vWf. Les articles suivants se rapportent essentiellement au dosage immunologique du FVIII R:Ag. Dans un premier temps, nous avons surtout employé la technique classique d'électroimmunodiffusion quantitative et nous avons présenté ces résultats, en comparaison de ceux obtenus par la technique de dosage du FVIII:C, chez la femme normale ou conductrice d'hémophilie A. Par la suite, nous nous sommes attachés à mettre au point une technique de dosage plus sensible : la technique immunoenzymatique de type ELISA présentée en 76, publiée en 77, et que nous avons améliorée depuis et employons, en routine, au C.R.T.S. de Lille. Enfin, le dernier article est consacré à la mise en évidence d'anticorps inhibiteurs de l'activité FVIII R:RCO du FvWf dans le plasma d'un malade chez qui nous avons diagnostiqué une maladie de vWd acquise et contribué à découvrir une macroglobulinémie de Waldenström.

I ACTION DES ANTICORPS ANTI-FACTEUR VIII SUR LA RETENTION DES PLAQUETTES AUX BILLES DE VERRE

C'est le premier travail que nous avons entrepris, dès 1973, époque à laquelle on ne savait pas encore que l'activité dénommée "facteur Willebrand" est supportée par une molécule distincte de celle supportant l'activité anti-hémophilique A. Il était destiné à mieux comprendre les relations existant entre le VIII R:Ag et le FVIII et consistait à étudier l'action de deux types d'anticorps, appelés à l'époque anti-facteur VIII, (l'un hétérologue, car obtenu à partir de sérum de lapin immunisé avec une fraction concentrée de FVIII, en fait du FVIII/vWf, précipitant le VIII R:Ag, (voir p. 39 à 43) ; l'autre homologue, ayant pour origine le plasma d'un hémophile A majeur ayant développé un anti-coagulant et neutralisant le VIII:C, (voir p. 84 à 90)), sur la rétention des plaquettes du sang au cours d'un passage sur billes de verre (test de BOWIE) qui est l'une des propriétés mesurables "in vitro" du FvWf, souvent en relation avec sa propriété de faire adhérer les plaquettes au sous-endothélium.

ACTION DES ANTICORPS ANTI-FACTEUR VIII SUR LA RÉTENTION DES PLAQUETTES AUX BILLES DE VERRE

C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ et M. GOUEMAND

Laboratoire d'Hémostase. Centre Régional de Transfusion Sanguine,
21, rue Camille-Guérin - 59000 Lille (France)

RÉSUMÉ. — En présence d'anticorps anti-facteur VIII hétérologues (obtenus chez le Lapin à partir de fractions concentrées en facteur VIII) la rétention aux billes de verre de plaquettes normales, mesurée par le test de Bowie, est très diminuée. Il en est de même lorsque l'on remplace le sang normal par du sang d'hémophile A majeur. Par contre, les anticorps anti-facteur VIII d'origine humaine ne modifient pas la rétention des plaquettes aux billes de verre. Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse de l'identité entre l'antigène facteur-VIII et le facteur responsable de la rétention des plaquettes aux billes de verre (facteur Willebrand). Ils apportent un nouvel exemple des différences d'action existant entre les anticorps anti-facteur VIII isologues et hétérologues.

Mots-clés : Plaquettes. — Rétention des plaquettes au verre. — Anticorps anti-facteur VIII. — Facteur Willebrand.

MAZURIER C., PARQUET-GERNEZ A., GOUEMAND M., 1973. — Action des anticorps anti-facteur VIII sur la rétention des plaquettes aux billes de verre. *Path.-Biol.*, 21, Suppl., 72-75.

Parmi les anomalies qui différencient *in vitro* l'hémophilie de la maladie de Willebrand il en est une, la diminution de la rétention des plaquettes aux billes de verre (test de Bowie), dont le mécanisme n'est pas encore très clairement expliqué. Pour la majorité des auteurs (4, 7, 9, 12, 14), il y a intervention d'un facteur plasmatique. Ce facteur est-il une protéine particulière appelée parfois « facteur Willebrand », ou ne s'agit-il pas du facteur VIII lui-même, qu'il soit ou non activé ? En faisant agir des anticorps (A.C.) hétérologues ou isologues sur du sang normal ou du sang d'hémophile A majeur nous avons recherché quelles plaquettes aux billes de verre et nous avons essayé d'interpréter les résultats obtenus.

MATERIEL ET METHODES

Les anticorps hétérologues sont obtenus par l'immunisation de lapins avec des fractions concentrées et semi-purifiées de facteur VIII selon la technique de Zimmermann et Ratnoff (13). Les anti-sérums après addition d'oxalate de NH₄ et de K, absorption par SO₂, Ba (100 mg par ml de sérum), chauffage à 56°C pendant 30 minutes et épuisement par du surnageant de cryoprécipités, donnent en immuno-diffusion une seule ligne de précipitation vis-à-vis de cryoprécipité normal, d'hémophile A majeur, et de fractions concentrées en facteur VIII. Ils ne donnent aucune réponse en présence de cryoprécipité de sujet atteint de maladie de Willebrand (fig. 1). Par la technique de Laurell (8-10), ils donnent un pic de précipitation avec du plasma normal pur ou dilué, du plasma d'hémophile A majeur, et ne donnent aucune précipitation avec du plasma de sujet atteint de maladie de Willebrand (fig. 2).

Les anticorps isologues proviennent d'un hémophile A majeur polytransfusé fortement immunisé contre le facteur VIII (anticorps titrant 75 unités).

La rétention des plaquettes aux billes de verre a été étudiée selon la technique de Bowie (3-5) en laissant reposer le sang hépariné pendant une heure, à 20°C, avant d'effectuer le test.

Manuscrit reçu à la Rédaction le 20 juin 1973.

Lorsque la rétention est étudiée en présence d'anticorps isologues ou hétérologues, le mélange est également laissé en contact pendant 1 heure à 20°.

Le dosage de l'activité facteur VIII est effectué sur le sang citraté selon la technique en 2 temps de Bergna (1). La recherche de l'activité anticoagulante des anticorps est faite selon une technique personnelle (6), en utilisant une concentration d'anticorps identique à celle utilisée dans le test de Bowie et en laissant incuber l'antigène et l'anticorps pendant 1 heure à 20°C avant d'effectuer le dosage.

RESULTATS

a) Action de l'anticorps hétérologue sur du sang normal.

En faisant incuber du sang normal avec de l'anticorps de lapin pendant 1 heure à 20°C et en réalisant ensuite un test de Bowie, on observe dans tous les cas une diminution de la rétention des plaquettes aux billes de verre (tableau I). Le dosage du facteur VIII effectué parallèlement sur un certain nombre d'échantillons montre également une diminution de l'activité du facteur VIII. La concentration d'anticorps donnant les résultats les plus reproductibles est de 7 µl pour 10 ml de sang. A cette concentration il n'y a aucune modification du chiffre des plaquettes après incubation avec l'anticorps hétérologue (tableau II) contrairement à ce que l'on observe pour des concentrations plus fortes de l'anticorps.

TABLEAU I. — Rétention des plaquettes sur billes de verre (test de Bowie) d'un sang normal sans A.C. et après incubation pendant 1 heure à 20°C avec un A.C. hétérologue (10 ml de sang hépariné + 7 µl de sérum de Lapin).

Rétention des plaquettes en pourcentage		Activité Facteur VIII en pourcentage	
Sans A.C.	Avec A.C.	Sans A.C.	Avec A.C.
43	0		
87	37		
57	22	70	< 1
65	26	180	62
66	12	77	5
67	10		
57	0	170	80
47	0	54	3
77	46		
81	11	100	10

TABLEAU II. — Exemples de résultats de numération de plaquettes dans le sang hépariné, sans incubation et après incubation avec un anticorps hétérologue (10 ml de sang hépariné + 7 µl de sérum de Lapin anti-facteur VIII).

Chiffre de plaquettes (par mm ³) sans A.C.	Chiffre de plaquettes (par mm ³) avec A.C. de lapin
135.000	130.000
105.000	115.000
160.000	145.000
210.000	220.000
140.000	130.000

b) Action de l'anticorps hétérologue sur du sang d'hémophile.

Avec du sang d'hémophile A majeur, les résultats sont identiques (tableau III). Sans anticorps, la rétention des plaquettes aux billes de verre est normale. Elle diminue après incubation avec l'anticorps de lapin, le taux de facteur VIII restant, bien entendu, nul dans les deux cas.

TABLEAU III. — Rétention des plaquettes sur billes de verre (test de Bowie) d'un sang d'hémophile A majeur sans A.C. et après incubation pendant 1 heure à 20°C avec un A.C. hétérologue (10 ml de sang hépariné + 7 µl de sérum de Lapin).

Rétention des plaquettes en pourcentage		Activité Facteur VIII en pourcentage	
Sans A.C.	Avec A.C.	Sans A.C.	Avec A.C.
82	34	< 1	< 1
78	25	< 1	< 1

c) Action de l'anticorps isologue sur du sang normal.

Si au lieu de mettre en contact du sang normal avec l'anticorps hétérologue, on ajoute un anticorps d'origine humaine, les résultats sont très différents. En effet, l'anticoagulant anti-facteur VIII isologue ne modifie absolument pas la rétention des plaquettes aux billes de verre d'un sang normal (tableau IV).

TABLEAU IV. — Rétention des plaquettes sur billes de verre (test de Bowie) d'un sang normal sans A.C. et après incubation pendant 1 heure à 20°C avec un A.C. d'origine humaine (10 ml de sang hépariné + 100 µl de sérum humain).

Rétention des plaquettes en pourcentage		Activité Facteur VIII en pourcentage	
Sans A.C.	Avec A.C.	Sans A.C.	Avec A.C.
65	61	180	70
66	61	77	39
67	63		
58	48	90	10

DISCUSSION

1°) Nos résultats montrent que l'anticorps anti-facteur VIII hétérologue modifie la rétention des plaquettes aux billes de verre de sang normal et de sang d'hémophile A majeur. Bien entendu divers contrôles sont nécessaires.

a) Nous avons tout d'abord vérifié que l'effet constaté n'est pas dû à la présence de sérum de la-

pin. De fait le pourcentage de rétention plaquettaire reste strictement normal après incubation avec du sérum de lapin non immunisé dans les mêmes conditions expérimentales.

b) L'action de l'anticorps semble être liée à son activité spécifique anti-facteur VIII. Bouma et coll., en 1972 (2), dans une série d'expériences comparables aux nôtres, ont montré que divers anticorps : anti-fibrinogène, anti-albumine, anti-gammaglobulines... n'ont pas d'effet sur le test de Bowie.

Par ailleurs en ce qui concerne les anticorps hétérologues utilisés dans nos expériences, nous avons pu montrer leur spécificité (fig. 1 et 2). D'autre part, en incubant préalablement l'anticorps de lapin avec du plasma de sujet atteint de maladie de Willebrand, et en effectuant ensuite un test de Bowie avec du sang normal comme précédemment, nous ne lui donnons pas son action inhibitrice de la rétention plaquettaire (tableau V).

TABLEAU V. — Etude de la rétention des plaquettes sur billes de verre (test de Bowie) d'un sang normal sans A.C. et en présence d'un A.C. hétérologue préalablement incubé avec du plasma de Willebrand.

Rétention des plaquettes sur billes de verre en pourcentage		Activité Facteur VIII en pourcentage	
Sans A.C.	Avec A.C.	Sans A.C.	Avec A.C.
43	0	54	4

La rétention des plaquettes aux billes de verre est donc liée à la présence de la molécule de facteur VIII qu'elle soit active comme chez le sujet normal ou inactive comme chez l'hémophile. Ces résultats sont en accord avec ceux de Bouma et coll. (2) et de Meyer et coll. (11). Il est très probable qu'il n'y a dans le plasma qu'une seule protéine ayant à la fois l'activité facteur VIII et l'activité rétention des plaquettes aux billes de verre. Il n'est cependant pas possible, d'après nos expériences, d'éliminer formellement la possibilité de deux molécules de structure extrêmement voisine.

2°) Ces résultats mettent en évidence les différences existant entre les anticorps d'origine humaine et d'origine animale :

— Les premiers neutralisent l'activité facteur VIII, mais ne sont pas précipitants. Ainsi que nous venons de le montrer, ils ne sont pas non plus capables d'inhiber la rétention des plaquettes aux billes de verre. Ils agiraient donc uniquement sur le site antigenique portant l'activité facteur VIII.

— Les anticorps d'origine animale sont neutralisants, précipitants et capables d'inhiber la rétention des plaquettes aux billes de verre. Ils seraient actifs dans l'hypothèse la plus vraisemblable où il s'agirait

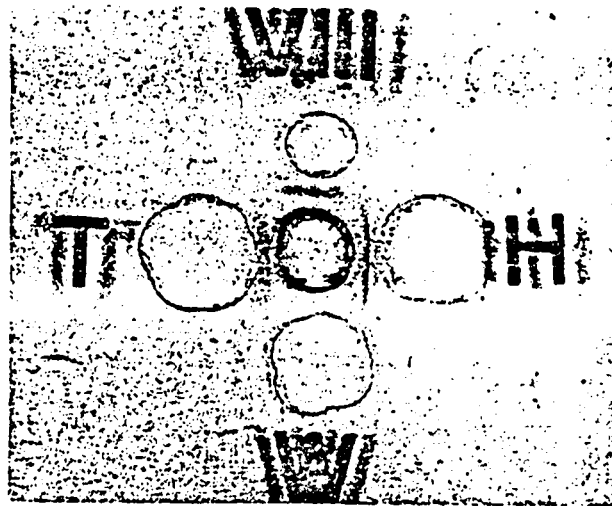


Fig. 1. — Contrôle en immunodiffusion selon la méthode d'Ouchterlony de l'antisérum de lapin épuisé par du surnageant de cryoprécipité :

- au centre, l'antisérum
- VIII = préparation de VIII purifiée selon la méthode de Ratnoff (13)
- T, H, W = cryoprécipités de plasmas témoin, d'hémophile, et d'un sujet atteint de maladie de Willebrand.

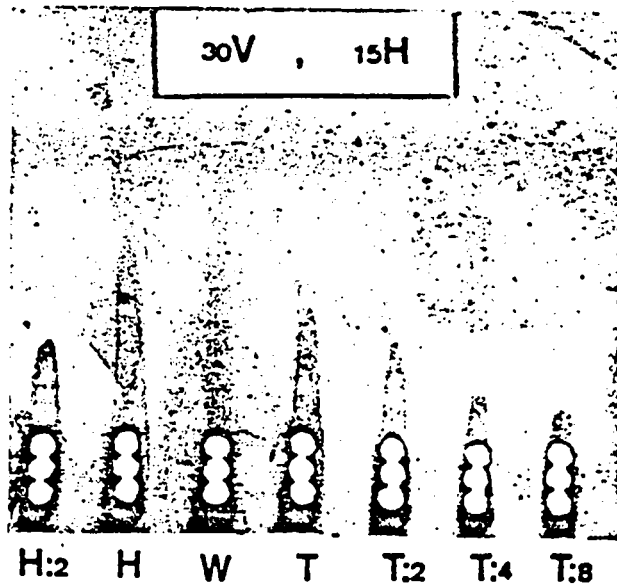


Fig. 2. — Electrophorèse dans 16 ml de gélose contenant 30 µl d'antisérum anti-facteur VIII de différents échantillons de 25 µl de plasmas. Migration de 15 h avec 30 V aux ponts dans le tampon véronal pH : 8,5 µ : 0,02 (méthode de Laurell).

- T = plasma témoin à différentes dilutions
- H = plasma d'hémophile pur et au demi
- W = plasma de sujet atteint de maladie de Willebrand (activité VIII = 6 %).

d'une protéine unique, à la fois sur l'activité facteur VIII et sur l'activité rétention des plaquettes aux billes de verre. Différentes possibilités de complexes avec la molécule de facteur VIII sont alors envisageables.

Les anticorps pourraient en effet soit se fixer sur les deux sites antigéniques responsables de l'activité facteur VIII et de l'activité rétention des plaquettes

aux billes de verre, soit se fixer sur l'un des deux et masquer le second qui peut être très proche du premier. Ils peuvent aussi ne pas différencier les deux sites antigéniques et se fixer indifféremment sur l'un ou sur l'autre.

Des indications plus précises sur la structure de la molécule de facteur VIII permettront sans doute de mieux préciser ces points.

ACTION OF ANTI-FACTOR VIII ANTIBODIES ON PLATELET
ADHERENCE TO GLASS BEADS

C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ and M. GOUDEMANT

Laboratoire d'Hémostase, Centre Régional de Transfusion Sanguine,
21, rue Camille-Guérin, 59000 Lille (France)

(Path.-Biol., 1973, 21, Suppl., 72-75)

SUMMARY. — Normal platelet's retention on glass beads measured by Bowie test, was strongly decreased when heterologous anti-factor VIII antibodies (obtained by Rabbit's immunisation with factor VIII concentrates) were added, either with normal blood or blood from severe haemophilic patients. On the other hand, human anti-factor VIII antibodies did not change the platelet's retention on glass beads.

These results favour the hypothesis of identity between factor VIII antigen and the factor responsible for platelet's retention on glass beads (von Willebrand's factor). They also illustrate the quite different activity of heterologous and isologous anti-factor VIII antibodies.

Key-words : Platelets. — Platelet retention on glass beads. — Anti-factor VIII antibodies. — Von Willebrand's factor.

RÉFÉRENCES

1. BERGNA L. J., 1960. — A simple method for the assay of factor VIII. *Blood*, 15, 637.
2. BOUMA B. N., WIEGERINCK-SIXMA J. J., VAN MOURIK J. A., 1972. — Immunological characterization of purified anti-haemophilic factor A (factor VIII) which corrects abnormal platelet retention in von Willebrand's disease. *Nature New Biol.*, 236, 104.
3. BOWIE E. J. W., OWEN C. A., THOMPSON J. H., DIDISHEIM P., 1969. — A test of platelet adhesiveness. *Proc. Mayo Clin.*, 44, 306.
4. BOWIE E. J. W., OWEN C. A., THOMPSON J. H., DIDISHEIM P., 1969. — Platelet adhesiveness in von Willebrand's disease. *Amer. J. Clin. Path.*, 52, 69.
5. CAEN J., SULTAN Y., 1971. — Actualités hématologiques, 5^e série. Masson et Cie éd., Paris, 207.
6. GOUDEMANT M., FOUCAUT M., 1963. — Mise en évidence et dosage d'un A.C. circulant au cours de l'hémophilie A. *Path. Biol.*, 11, 361.
7. LARRIEU M. J., CAEN J. P., MEYER D., VAINER H., SULTAN Y., BERNARD J., 1968. — Congenital bleeding disorders with long bleeding time and normal platelet count. II von Willebrand's disease. *Amer. J. Med.*, 45, 354.
8. LAUFELL C., 1966. — Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analyt. Biochem.*, 15, 45.
9. MEYER D., LARRIEU M. J., 1970. — Von Willebrand factor and platelet adhesiveness. *J. Clin. Path.*, 23, 228.
10. MEYER D., LAVERGNE J. M., LARRIEU M. J., JOSSE F., 1972. — Cross reacting material in congenital factor VIII deficiencies (haemophilia A and von Willebrand's disease). *Thromb. Res.*, 1, 183, 18.
11. MEYER D., LARRIEU M. J., 1972. — Le facteur Willebrand - Biologie et Immunologie. Communication à la 4^e réunion du groupe d'études sur l'Hémostase et la Thrombose, Paris, 9 décembre 1972.
12. SALZMANN E. W., BRITTON A., 1964. — *In vitro* correction of defective platelet adhesiveness in von Willebrand's disease. *Fed. Proc.*, 23, 239.
13. ZIMMERMAN T. S., RATNOFF O. D., POWELL A. E., 1971. — Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease. *J. Clin. Invest.*, 50, 244.
14. ZUCKER M. B., 1963. — *In vitro* abnormality of the blood in von Willebrand's disease correctable by normal plasma. *Nature (Lond.)*, 197, 601.

Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux publiés par BOUMA et al. (646) et MEYER et al. (647) à la même époque. Les conclusions, en faveur de "l'identité entre l'antigène facteur VIII et le facteur responsable de la rétention des plaquettes aux billes de verre (facteur Willebrand)" sont tout à fait dans la ligne du concept actuel du complexe FVIII/vWf puisqu'on appelait alors "antigène facteur VIII" ce qu'on appelle encore actuellement le "FVIII R:Ag" et qui devrait plutôt se dénommer "FvWf:Ag" puisqu'il s'agit de la molécule antigénique support des activités du facteur Willebrand, et non pas de l'antigène lié au facteur VIII qui est le FVIII:C Ag. En ce qui concerne "les différences d'action existant entre les anticorps isologues et hétérologues", il était démontré que les anticorps d'hémophiles n'inhibent pas la rétention des plaquettes aux billes de verre et qu'ils "agiraient donc uniquement sur le site antigénique portant l'activité VIII" ce qui, à l'heure actuelle, se conçoit très bien si on admet qu'il s'agit d'allo-anticorps, en général capables de se lier au FVIII C:Ag. Les anticorps hétérologues, eux, s'avéraient inhibiteurs de la rétention, ce qui s'explique facilement maintenant qu'on sait que les animaux étaient immunisés non pas simplement avec du FVIII mais avec le complexe FVIII/vWf et que, dans ces conditions, ils développent essentiellement des anticorps anti-vWf et, de façon annexe, des anticorps dirigés contre le FVIII, à l'origine de leur activité anticoagulante qui les avait fait dénommer anticorps anti-FVIII (voir p. 39 à 41).

II ACTION DES ANTICORPS HOMOLOGUES ANTI-FACTEUR VIII INSOLUBILISES SUR L'ANTIGENE LIE AU FACTEUR VIII

Cette étude, comme la précédente, avait pour but de contribuer à élucider les relations existant entre le facteur VIII et le facteur Willebrand en recherchant si des anticorps homologues, ayant une activité anti-VIII:C mais ne précipitant pas le VIII R:Ag (voir p.84 à 90), sont néanmoins capables de se lier avec ce VIII R:Ag qu'on savait alors être le support de l'activité vWf. Pour ce faire, nous avons comparé le taux de VIII R:Ag d'un plasma normal, d'un plasma hémophile, et d'une fraction purifiée de F vWf, avant et après passage sur des immunoadsorbants constitués d'immunoglobulines isolées de sérums normaux ou de 2 malades avec anticoagulant anti-VIII:C. Nous avons, en outre, par augmentation de la force ionique, élué les molécules fixées et recherché le VIII R:Ag dans les éluats d'un immunoadsorbant contrôle, contenant des IgG isolées de plasma normal, et des immunoadsorbants contenant les auto-et les allo-anticorps (l'un des malades ayant développé spontanément son anticoagulant, l'autre étant un hémophile polytransfusé).

ACTION OF INSOLUBILIZED HOMOLOGOUS ANTI-FACTOR VIII ANTIBODIES
ON FACTOR VIII-RELATED ANTIGEN

C. MAZURIER, M. KACEM, A. PARQUET-GERNEZ, M. GOUDEMARD

Laboratoire d'Hémostase, Centre Régional de Transfusion Sanguine
21, rue C. Guérin - 59000 LILLE - FRANCE

(Received 1.8.1976; in revised form 8.3.1977.
Accepted by Editor M.J. Larrieu)

ABSTRACT

Immunoabsorption experiments were performed to study the action of homologous anti-factor VIII antibodies on factor VIII-related antigen (VIII R : Ag). Two factor VIII inhibitors, one from a hemophiliac patient, the second from an otherwise normal patient, were studied after coupling to CNBr-activated Sepharose. Both antibodies bound VIII R : Ag specifically. The presence of factor VIII procoagulant activity (VIII : C) did not appear necessary for this interaction since VIII R : Ag dissociated from VIII : C by salt dissociation and VIII R : Ag of a severe hemophiliac were also equally bound. These results suggest that the action of homologous anti-factor VIII antibodies is not limited to the neutralizing effect on VIII : C.

INTRODUCTION

Until recently, factor VIII had been characterized only by its procoagulant activity (VIII : C). Immunological studies have since helped to clarify some of its properties. Heterologous antibodies raised in rabbits against purified human factor VIII not only inhibit VIII : C but also precipitate a normal plasma protein which appears to be closely associated with it. This antigenic material (VIII R : Ag) is also present in hemophilia A plasma and in normal serum, but is decreased in the plasma of patients with von Willebrand disease. Homologous antibodies to VIII : C occur either in some polytransfused patients with hemophilia A or spontaneously in patients with no prior history of bleeding. None of these human inhibitors precipita-

tes VIII R : Ag. However by "inhibitor neutralization test" Goudemand (1) showed that homologous anti-VIII : C antibodies are neutralized not only by normal plasma but also by normal sera or plasmas from some patients with hemophilia A (2). Hemophilia A can thus be divided into two types based on the presence (A+) or absence (A-) of inhibitor neutralizing material. However a number of authors (3,4) have shown that by varying the antibody concentration and incubation times, the majority of hemophiliacs can be shown to have antigenic material capable of interacting with and neutralizing homologous inhibitors.

The present study attempts to elucidate the action of human anti-VIII : C antibodies on the VIII R : Ag of normal and hemophilia A plasma.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies. The experiments were carried out using two human anti-VIII : C antisera. The first one had developed in a patient with hemophilia A (S.T.) who had been transfused exclusively with human fractions. In this patient's plasma, the inhibitor titer, expressed by the method of Kasper (5) was 1500 Bethesda units/ml. The second was a spontaneous inhibitor occurring in a 77-year old woman (D.E.) with no definite evidence of an associated disease. The inhibitor titer was 500 Bethesda u/ml.

Samples analyzed. Normal and hemophilia A plasmas were prepared by anticoagulation of freshly collected whole blood with 0.38 p.cent sodium citrate and centrifugation at 1200 g for 30 min. at 4°C. A high molecular weight fraction of factor VIII (HMW) was obtained by gel filtration of a factor VIII-rich fraction on Sepharose 6 B equilibrated in 0.02 M imidazole, 1 M NaCl, pH 6.5 buffer (6). The fraction collected at the void volume was devoid of procoagulant activity but contained 8 u/ml of VIII R : Ag.

Factor VIII coagulant activity and VIII-related antigen Assays. VIII : C was assayed by a one-stage method (7). The procoagulant activity could not be assayed in phosphate containing buffer. The factor VIII R : Ag was measured by the Laurell quantitative immunoelectrophoresis (8) using dilutions of plasma. The standard was a pool of normal citrated plasmas prepared from 20 normal healthy individuals stored at -80°C for a maximum of one month.

Immunoabsorbents. One volume of saturated Ammonium sulphate was separately added to two volumes each of the anti-VIII : C antisera and of a serum from a hemophiliac without anti-VIII : C activity. The precipitate obtained after centrifugation was redissolved in two volumes of 0.05 M sodium carbonate, pH 9.0 buffer and dialysed against this buffer for 48 hrs. The anti-VIII : C activity in each was about 1500 u/ml (S.T.) and 500 u/ml (D.E.). 400 mg of the dialysed gamma-globulin fractions were coupled to 40 ml of CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia - Uppsala - Sweden) according to the method of Axen *et al.* (9) and separately packed into columns (2 x 28 cm), washed alternately with pH 4 and 8.5 buffers and then equilibrated in 0.1 M phosphate buffered saline, pH 7.5 (PBS). In consecutive experiments 0.5 ml of normal plasma, plasma from a patient with severe hemophilia A (without inhibitor) and HMW fraction were applied to the columns and the columns were washed with 250 ml PBS. The flow rate was 8 ml/hr. Samples were collected in two ml aliquots and the protein continuously monitored by absorbance at 280 nm. The filtrates obtained during washing were pooled and concentrated by pressure dialysis to the initial volume of the sample using a UH 100 membrane (Schleicher and Schüll - Dassel - Germany). Then the specifically bound proteins were eluted (18 ml/hr) with NaSCN 3 M in 0.1 M acetate buffer pH 6.0, collected and concentrated as before. Each experiment was performed in duplicate and each sample tested for VIII R : Ag.

RESULTS

Homologous anti-VIII : C antibodies insolubilized onto Sepharose appear to be capable of interacting with VIII R : Ag. Less than 10 % of the VIII R : Ag of plasma applied to such columns was recovered in the filtrate. However following application of 3 M NaSCN a protein peak was eluted which contained the residual 80 % VIII R : Ag (table I). Anti-VIII : C antibodies arising in a hemophiliac (S.T.) or occurring spontaneously in a non-hemophiliac patient (D.E.) appeared to have similar properties (table I and II). These factor VIII inhibitors also appeared to bind VIII R : Ag from severe hemophiliacs and from the HMW fraction obtained by salt dissociation (table II and III). Both these sources of VIII R : Ag are devoid of VIII : C. Over six experiments with different sources of VIII R : Ag the yield of VIII R : Ag recovered from the column by NaSCN elution varied from 40-86 % with a mean of 69 %.

TABLE I

0.5 ml plasma were applied to two separate columns to which had been bound either IgG from a hemophiliac without circulating inhibitor (H.A.) or IgG from a hemophiliac with a circulating inhibitor (S.T.). The initial filtrate after washing with 250 ml PBS and the eluate after subsequent washing with NaSCN were collected and concentrated to 0.5 ml and assayed for VIII R : Ag.

	Control Column (H.A.)	Homologous Antibody Column (S.T.)
Starting material	Normal plasma 1.10 u/ml	Normal plasma 1.00 u/ml
Filtrate	0.6 u/ml	< 0.10 u/ml
Eluate	< 0.10 u/ml	0.8 u/ml



TABLE II

Recovery of VIII R : Ag in PBS filtrate and subsequent NaSCN eluate from column to which had been bound the IgG from a patient with a spontaneous inhibitor to VIII : C. Both normal plasma and the plasma of two patients with severe hemophilia A were tested.

Sample Applied	Fraction Assayed	VIII R : Ag (u/ml)
Normal plasma (VIII : C = 0.8 u/ml)	Starting material	0.8
	Filtrate	< 0.1
	Eluate	0.5
Hemophilic A plasma (VIII : C < 0.01 u/ml)	Starting material	1.15
	Filtrate	< 0.1
	Eluate	0.72
Hemophilic A plasma (VIII : C < 0.01 u/ml)	Starting material	1.00
	Filtrate	< 0.1
	Eluate	0.40

This ability to bind VIII R : Ag appeared to be specific. The Sepharose column to which had been bound the control IgG (hemophiliac without inhibitor) did not appear to significantly adsorb VIII R : Ag. Sixty per

cent of the applied VIII R : Ag was recovered in the filtrate during washing and no significant VIII R : Ag was eluted with NaSCN (table I).

TABLE III

Recovery of VIII R : Ag in PBS filtrate and subsequent NaSCN eluate from homologous antibody column (ST) after application of two different sources of VIII R : Ag devoid of VIII : C

	Hemophilic A plasma	HMW fraction
Starting material	1.10 u/ml	8.00 u/ml
Filtrate	< 0.10 u/ml	< 0.10 u/ml
Eluate	0.90 u/ml	6.90 u/ml

DISCUSSION

Homologous antibodies, whether spontaneous or acquired in hemophilia A, neutralize the human factor VIII procoagulant activity (VIII : C). Contrary to heterologous rabbit antibodies, homologous antibodies do not precipitate with VIII R : Ag and it is uncertain if they have any action on VIII R : Ag.

From the results presented here it appears that the VIII R : Ag of a normal plasma is adsorbed onto two human inhibitors which are insolubilized on Sepharose 4 B. This fixation is specific. It does not occur with similarly insolubilized gamma-globulin fraction of hemophilic serum with no VIII : C inhibitor activity. The two homologous anti-factor VIII also bind the VIII R : Ag of different patients with hemophilia A who had seemed to have no detectable antigenic material by the "inhibitor neutralization test" of Goudemand *et al.* (A-). However this immunoadsorption method does not allow any quantitative measurement of the amount of VIII R : Ag in the different samples studied. It should also be considered possible that heterogeneity amongst homologous antibodies could exist with respect to their action on VIII R : Ag.

Previously, other authors (10, 11) reported the absence of fixation of VIII R : Ag onto homologous antibodies. Zimmerman and Edgington (10) showed that there was a 58 % loss of VIII : C without decrease of VIII R :

Ag in the supernatant of a normal plasma incubated with hemophilia antibody beads in a batch system. Moreover, Hougie and Sargeant (11), demonstrated differential precipitation of the procoagulant activity but not of the antigen following complex formation between anti-VIII homologous antibodies and cryoprecipitate.

Our experiments performed under different experimental conditions show that homologous antibodies, characterized in particular by their neutralizing action on VIII : C are able to bind VIII R : Ag even if it is devoid of procoagulant activity. These results suggest that factor VIII : C and VIII R : Ag have common antigenic determinants, a hypothesis which has already been made by others authors (2, 12, 14, 15).

REFERENCES

1. GOUDEMAM, M., FOUCAUT, M., HUTIN, A. and PARQUET-GERNEZ, A. Les anti-coagulants circulants anti-facteur VIII au cours de l'hémophilie A. *Nouv. Rev. Franç. Hémat.* 3, 703, 1963
2. GOUDEMAM, M., PARQUET-GERNEZ, A. and FECELLE, A. Hémophilie. Les variants des facteurs VIII et IX - Discussion I. *Nouv. Rev. Franç. Hémat.* 10, 627, 1970
3. DENSON, K., BIGGS, R., HADDON, M., BORRETT, R. and COBB, K. Two types of haemophilia (A+ and A-) : a study of 48 cases. *Br. J. Haemat.* 17, 163, 1969
4. BIGGS, R. The absorption of human factor VIII neutralizing antibody by factor VIII. *Br. J. Haemat.* 26, 259, 1974
5. KASPER, C.K. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb. Diath. Haemorrh. (Stuttg.)*. 34, 869, 1975
6. MAZURIER, C., PARQUET-GERNEZ, A., GOUDEMAM, M. and MONTREUIL, J. Contribution à l'isolement et à l'étude de la masse moléculaire du facteur VIII humain. *Path. Biol.* 23 (Suppl.), 11, 1975
7. SOULIER, J.P. and LARRIEU, M.J. Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des facteurs antihémophiliques A et B. *Sang* 24, 205, 1953
8. LAURELL, C.B., Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* 15, 45, 1966
9. AXEN, R., PORATH, J. and ERNBACK, S. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*. 214, 1302, 1967

10. ZIMMERMAN, T. and EDGINGTON, T. Factor VIII coagulant activity and factor VIII-like antigen : independant molecular entities. *J. Exp. Med.* 138, 1015, 1973
11. HOUGIE, C. and SARGEANT, R. Antigen/ Biological activity ratio for factor VIII. *Lancet.* 7814, 1247, 1973
12. BOUMA, B.N., de GRAAF, S., HORDIJK-HOS, J.M., Van MOURIK, J.A. and SIXMA, J.J. Investigations on the relationship of factor VIII related antigen, factor VIII procoagulant activity and von Willebrand factor activity using insolubilized rabbit antiserum. *Thromb. Res.* 7, 695, 1975
13. BENNET, B., FORMAN, W. and RATNOFF, O. Studies on the nature of anti-hemophilic factor. Further evidence relating the AHF-like antigens in normal and hemophilic plasmas. *J. of Clin. Invest.* 52, 2191, 1973
14. PEAKE, I. and BLOOM, A.L. The dissociation of factor VIII by reducing agents, high salt concentration and affinity chromatography. *Thrombos. Haemostas. (Stuttg.)* 35, 191, 1976
15. STRATTON, R.D., WAGNER, R.H., WEBSTER, W.P. and BRINKHOUS, K.M. Antibody nature of circulating inhibitor of plasma von Willebrand factor. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 72, 4167, 1975

Les résultats de ces expérimentations montrent que nous avons fixé du FVIII R:Ag sur les colonnes constituées d'IgG isolées de sérums de malades ayant des auto- et des allo-anticorps anti VIII:C, cette fixation n'étant pas observée sur un immunoabsorbant contrôle constitué d'IgG isolées d'un plasma témoin. Nous avons conclu à l'époque qu'il existe certainement des déterminants antigéniques communs entre la molécule de FVIII et la molécule de FvWf. Cette conclusion est en contradiction avec le concept actuel de deux molécules différentes mais il faut noter cependant plusieurs points :

1 - Certains éléments sont difficilement compatibles avec la théorie actuelle selon laquelle le FVIII et le FvWf n'ont pas de déterminant antigénique commun : par exemple, ceux de BOUMA et al. (648) et de PEAKE et BLOOM (649) qui montrent que des anticorps de lapin immunisé avec du FVIII dépourvu de FvWf ont, non seulement une activité anti VIII:C, mais précipitent le VIII R:Ag et inhibent l'activité VIII R:RCO d'un plasma normal.

2 - Les résultats de certains autres auteurs, que nous avons mentionné p. 88, semblent également montrer qu'il peut y avoir action des anticorps homologues, appelés anti-VIII, sur l'activité VIII R:vWf et que cela ^{se} traduit parfois ^{par} des anomalies du VIII R:RCO ou de l'adhésion des plaquettes chez certains malades avec anticoagulant anti-VIII:C (BOWIE et OWEN : 650, KOUTTS et al. : 651, BALLARD et al. : 652). THOMSON et al. (653), ont, de plus, mis en évidence un effet inhibiteur de l'agrégation des plaquettes à la ristocétine dans les sérums d'hémophiles avec anticoagulant et nous même, au laboratoire, avons constaté un effet inhibiteur du VIII R:RCO dans les sérums de 4 malades, 2 ayant un auto-anticorps, 2 ayant un allo-anticorps, sans qu'il semble toutefois, corrélé avec le degré d'inhibition de l'activité VIII:C (BEN KACEM : 654).

3 - Enfin, plusieurs expérimentations analogues à la nôtre, qui tendent à montrer qu'il n'y a pas de fixation du FVIII R:Ag sur les anticorps homologues, doivent être discutées. D'abord, il y eut la communication brève de HOUGIE et SARGEANT (655) disant que l'addition d'anti-IgG humaines à un mélange d'anticorps anti-VIII homologues et de cryoprécipité entraîne la disparition de l'activité VIII:C, mais pas celle du VIII R:Ag, dans le surnageant. Cette publication ne spécifie pas s'il

s'agit d'auto- ou d'allo-anticorps anti-VIII:C ni les quantités d'anticorps, de VIII:C et VIII R:Ag mis en présence. Ensuite, le travail de ZIMMERMAN et EDGINGTON (656), beaucoup mieux explicité, qui montrent que, lorsqu'ils mettent en présence d'un plasma contenant 0,5 U de FVIII R:Ag et de FVIII:C, des billes où sont couplées l'équivalent de 2,5 U à 60 unités Oxford d'anti-VIII:C, il n'y a pas diminution du VIII R:Ag du plasma alors que son activité VIII:C s'annule progressivement. Dans les deux cas les auteurs concluent qu'il n'y a pas de communauté antigénique entre le support du VIII:C et le VIII R:Ag mais on pourrait dire aussi, maintenant que l'on sait que la plupart du FVIII du plasma est lié au FvWf, que ces résultats impliquent que les anticorps anti-VIII homologues induisent une dissociation du FVIII du FvWf, puisque celui-ci n'est pas fixé par les anticorps par l'intermédiaire du FVIII. Or ceci est en contradiction avec les résultats récents de THOMAS et al. (657) qui montrent que des anticorps hétérologues anti-VIII R:Ag sont capables de se fixer au VIII/vwf du plasma, lui-même fixé sur des anti-VIII homologues (voir p. 96). On peut donc se demander si les différences de proportions entre antigène et anticorps dans les expérimentations précédant les nôtres et dans notre travail, où nous utilisons un grand excès d'anticorps, puisqu'on a selon les cas insolubilisé 20 000 à 60 000 U Bethesda anti VIII:C sur une colonne où l'on ajoute que l'équivalent de 0,5 U de FVIII R:Ag, ne sont pas à l'origine des discordances de résultats. Cette constatation est également valable dans les expérimentations plus récentes de LANE et al. (658) qui montrent que l'équivalent de 500 à 6000 U d'anti-VIII:C, provenant de 3 hémophiles avec anticoagulant, retient, à partir de 0,5 ml de FVIII/vwf purifié (dont les taux de VIII:C et de VIII R:Ag ne sont pas spécifiés) beaucoup moins de VIII R:Ag que de VIII:C. Il faut noter toutefois que, dans ce travail, l'immunoabsorbant contrôle ne fixe que 5 % du FVIII R:Ag de la préparation, alors que, dans certains cas, les immunoabsorbants formés d'allo-anticorps fixent jusqu'à 33 % du FVIII R:Ag.

En fait, tous les points mentionnés ci-dessus nous amènent à penser que nos résultats peuvent s'expliquer, non seulement comme nous l'avons fait à l'époque, par une communauté antigénique du FVIII et du FvWf, mais également par l'existence possible, dans les sérums des malades que nous avons étudié, d'une petite quantité d'anticorps anti-vwf à côté des anticorps anti-VIII responsables de l'activité anti-VIII:C. L'activité

anti-vWf serait, tout comme l'activité anti-FVIII des anticorps hétérologues de lapin (voir p. 38 à 41), en fait accessoire et variable d'un malade à l'autre. Une autre possibilité serait qu'en fait, nous avons fixé le VIII R:Ag du plasma par l'intermédiaire du FVIII qui lui est associé; dans ce cas, néanmoins, il faudrait admettre que le plasma d'hémophile A que nous avons utilisé contenait en fait du FVIII C:Ag, ce qui est peu probable; et que la fraction HMW que nous avons préparé n'était pas totalement dépourvue de FVIII.

Finalement, de nombreuses questions restent sans réponse après cette étude et il est certain que si nous devons la reprendre à l'heure actuelle, nous tiendrons compte d'éléments nouveaux, notamment concernant l'hétérogénéité des anticorps homologues anti-VIII:C mise en évidence encore récemment par GAWRYL et HOYER (659). Il serait intéressant de compléter notre méthodologie par un contrôle des taux de VIII C:Ag et une étape d'éluion par le CaCl_2 0,25 M dans le but de dissocier éventuellement le FvWf du FVIII avant de dissocier les liaisons de type anti-gène-anticorps.

III DEPISTAGE DES CONDUCTRICES DE L'HEMOPHILIE A PAR DOSAGE COMPARATIF DE L'ACTIVITE ET DE L'ANTIGENICITE FACTEUR VIII

Dans cet article nous avons reporté les résultats obtenus lors du dosage comparatif de l'activité VIII:C, par la technique en 2 temps (p.94), et du VIII R:Ag, par la technique de LAURELL (p.55) chez la femme normale ou chez la conductrice d'hémophilie A. On appelle conductrice d'hémophilie la femme qui, de par une anomalie d'un gène situé sur l'un de ses 2 chromosomes X, n'a qu'une chance sur deux d'avoir des enfants "normaux" car elle peut, de façon statistique une fois sur deux, transmettre sa tare à un garçon qui sera hémophile ou à une fille qui sera, elle aussi, conductrice d'hémophilie.

Il y a quelques années encore, le diagnostic de conductrice d'hémophilie A, qui est si important pour les femmes dites conductrices probables, c'est à dire soeurs d'hémophiles ou filles de conductrices, était encore très aléatoire puisqu'on ne détectait d'anomalie biologique, sous forme d'une diminution du taux de F VIII:C (MULDER et al. : 660), que chez moins de 50 % des femmes pourtant conductrices certaines. C'est pourquoi, les résultats de ZIMMERMAN et al. (661) publiés en 1971 qui montraient que le rapport R du taux de F VIII:C sur le taux de VIII R:Ag était un élément discriminatif permettant de distinguer les femmes normales ($R \approx 1$), des conductrices ($R \approx 0,5$) ont incité de nombreuses équipes à appliquer la même méthodologie. C'est dans ce contexte qu'a débuté notre étude qui visait, d'une part à déterminer si ce rapport est une constante biologique relativement stable chez une femme donnée et, d'autre part, à le comparer dans une population de femmes normales ou conductrices certaines d'hémophilie A.

DÉPISTAGE DES CONDUCTRICES DE L'HÉMOPHILIE A PAR DOSAGE COMPARATIF DE L'ACTIVITÉ ET DE L'ANTIGÉNICITÉ FACTEUR VIII

A. PARQUET-GERNEZ, Cl. MAZURIER et M. GOUEMAND

*Laboratoire d'Hémostase, Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille,
21, rue C.-Guérin, 59000 Lille (France)*

RÉSUMÉ. — Le rapport activité/antigénicité facteur VIII est très nettement abaissé ($\leq 0,5$) dans la majorité des conductrices certaines (16 fois sur 18), ce qui permet donc de dépister les conductrices avec une probabilité beaucoup plus grande qu'en se basant uniquement sur le taux de l'activité facteur VIII. L'exercice musculaire, le cycle menstruel ne modifient guère ce rapport, du fait d'une augmentation parallèle des deux données de base. Au cours de la grossesse chez 16 femmes normales le rapport n'a pas été modifié de façon significative pour 13 d'entre elles, mais dans 3 cas le rapport a été abaissé du fait d'une plus grande augmentation de l'antigénicité. Néanmoins chez 2 conductrices certaines le rapport est resté voisin de 0,5 en dehors et au cours de la grossesse. Il semble donc que l'adjonction du dosage immunologique du facteur VIII à la mesure de son activité coagulante permet dans près de 90 % des cas de faire le diagnostic de conductrice.

Mots-clés : Facteur VIII. — Conductrices d'hémophilie A. — Dosage immunologique du facteur VIII. — Grossesse. — Exercice musculaire.

PARQUET-GERNEZ A., MAZURIER Cl., GOUEMAND M., 1974. — Dépistage des conductrices de l'hémophilie A par dosage comparatif de l'activité et de l'antigénicité facteur VIII. *Path. Biol.*, 22, suppl., 37-42.

Le dépistage des femmes conductrices de l'hémophilie A apparaît devoir être considérablement amélioré grâce aux techniques immunologiques de détection de l'antigène facteur VIII, dans la mesure où les femmes possèdent dans leur plasma un taux d'antigène beaucoup plus élevé que de facteur VIII coagulable. Si cette notion ressort de divers travaux récents, la valeur statistique à lui accorder varie suivant les auteurs. C'est pourquoi nous avons voulu apporter ici les résultats obtenus chez un certain nombre de femmes conductrices et en discuter la valeur diagnostique.

Manuscrit reçu à la Rédaction le 12 juin 1974.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les échantillons de sang sont prélevés en tubes plastique neufs sur citrate de Na à 3,8 p. 100 (1 volume pour 9 volumes de sang), puis centrifugés à 4 000 t/mn pendant 30 minutes à + 4°C. Les plasmas décantés sont conservés en tubes plastique à + 4°C jusqu'au moment du dosage de l'activité qui est toujours effectué moins de cinq heures après le prélèvement.

— Les sujets explorés comprennent :

. 18 conductrices certaines d'hémophilie (soit mères d'au moins deux enfants hémophiles ou d'un enfant hémophile avec antécédents d'hémophilie dans la famille, soit filles d'hémophile).

. 26 conductrices possibles parmi lesquelles : 10 mères d'un seul garçon hémophile, sans autres antécédents familiaux connus et 16 sœurs d'hémophiles.

. 20 femmes normales, non ménopausées qui ont servi de référence. Certaines femmes normales ont été étudiées au cours d'un exercice musculaire, pendant le cycle menstruel, en fin de grossesse.

- Mesure de l'activité coagulante.

L'activité coagulante du facteur VIII est mesurée selon une technique en deux temps (3). Une unité coagulante correspond à l'activité coagulante de 1 ml de plasma témoin, constitué d'un mélange d'au moins cinq plasmas de sujets adultes sains, conservé en petites quantités, à -80 °C pendant un maximum d'un mois.

- Mesure de l'antigénicité.

Cette mesure est réalisée grâce à la méthode d'électrodiffusion quantitative de Laurell (10-13).

1) Antisérum utilisé.

Des anticorps hétérologues sont obtenus par l'immunisation de lapins avec des fractions concentrées et semi-purifiées de facteur VIII selon la technique de Zimmermann et Ratnoff (21). Ces antisérums, après addition d'oxalate de NH₄ et de K, absorption par SO₄ Ba (100 mg par ml de sérum) chauffage à 56°C pendant 30 minutes, et épuisement par du surnageant de cryoprécipité, donnent en immuno-diffusion une seule ligne de précipitation vis-à-vis de cryoprécipité normal, d'hémophile A majeur, et de fractions concentrées en facteur VIII. Ils ne donnent aucune réponse en présence de cryoprécipité de sujet atteint de maladie de Willebrand. Par la technique de Laurell ils donnent un pic de précipitation avec du plasma normal pur ou dilué, du plasma d'hémophile A majeur et ne donnent aucune précipitation avec du plasma de sujet atteint de maladie de Willebrand (avec activité facteur VIII faible) (fig. 1).

2) Mode opératoire.

Sur des plaques de 18,5 X 9,5 cm sont coulés 32 ml de gélose A 37 à 1 p. 100 contenant 20 µl d'antisérum de lapin anti-facteur VIII. Les dépôts de 15 µl de plasma sont effectués dans des puits de 4 mm de diamètre. L'électrophorèse dure 15 heures, sous une tension de 25 volts aux ponts, avec un tampon véronal de pH 8,6 et de force ionique 0,02. Après lavage et séchage, les plaques sont colorées au bleu de Coomassie.

3) Calcul de l'antigénicité.

Le calcul de l'antigénicité se fait en établissant une courbe étalon à partir des hauteurs de pic de différentes dilutions de plasma témoin déposées sur la même plaque que les échantillons à analyser. Le plasma témoin est celui qui a été utilisé pour la détermination de l'activité coagulante de l'échantillon. Pour un sujet donné, le taux d'antigène est calculé à partir de deux plaques d'électrophorèse et représente la moyenne de plusieurs valeurs obtenues avec l'échantillon pur et éventuellement dilué au demi et au quart. Par définition, 1 ml de plasma témoin normal contient une unité d'antigène facteur VIII.

RÉSULTATS

1) Femmes normales.

Considérant qu'une unité correspond à l'activité biologique et immunologique facteur VIII d'un ml de plasma frais normal, nous avons trouvé chez 20 femmes normales une activité coagulante de 0,3 à 2 unités par ml avec une moyenne de 0,92 et un taux d'antigène moyen de 0,97 unité par ml avec des extrêmes allant de 0,38 à 2,30. Le rapport moyen de l'activité sur l'antigène est alors de 1,06 avec des écarts de 0,52 à 1,97.

2) Conductrices certaines.

L'activité coagulante moyenne de ces femmes est de 0,42 unité par ml avec des écarts allant de 0,15 à 0,70. Le taux d'antigène varie de 0,44 à 2,35 unités par ml avec une moyenne de 1,08. Le rapport moyen de l'activité sur l'antigène facteur VIII est de 0,38 avec des écarts allant de 0,12 à 1,25.

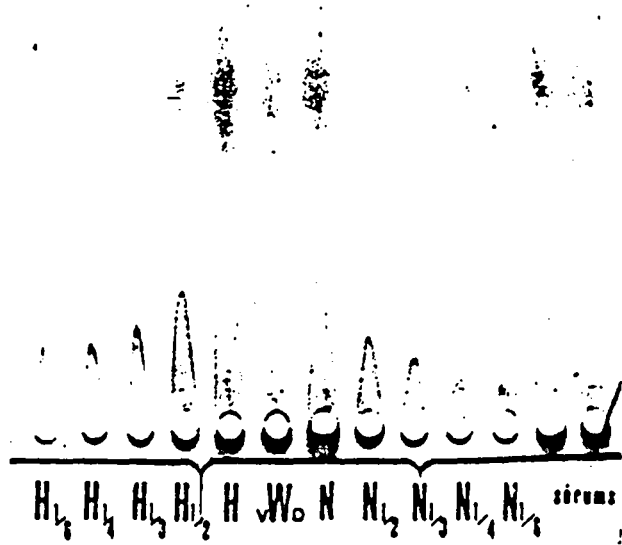


Fig. 1. — Dosage de l'antigène facteur VIII par la méthode de Laurell.

N : plasma témoin normal à différentes dilutions ;
H : plasma d'hémophile A majeur à différentes dilutions ;
W : plasma de sujet atteint de maladie de Willebrand (activité VIII = 0,06 U/ml).

La figure 2 montre la répartition des femmes normales autour de la droite de régression avec la limite de confiance de 99 %. La majorité des conductrices certaines se situe nettement au-dessous de cette limite de confiance. Deux d'entre elles se trouvent cependant dans la zone des femmes normales. On peut remarquer aussi qu'une des femmes normales se trouve parmi les conductrices. Si l'on exprime les résultats de façon un peu différente en portant en ordonnée le rapport activité sur antigène et en abscisse l'activité facteur VIII (fig. 3) on peut mieux séparer les deux populations de femmes. Il n'en demeure pas moins qu'il existe une région limite (aux environs d'un rapport Act/Ag de 0,50 à 0,60) où il est possible de trouver à la fois des femmes normales et des conductrices : chez deux femmes conductrices le rapport est supérieur à 0,55 et chez trois, supérieur à 0,50. Ainsi sur un total de 18 conductrices, le diagnostic ne pourrait être affirmé sur des critères biologiques que dans 16 cas.

Il est assez troublant de constater que les trois cas de conductrices certaines qui ont un rapport Act/Ag supérieur à 0,50 (0,55, 0,88 et 1,5) sont trois sœurs, filles d'hémophile A majeur connu (fig. 4). Les examens biologiques ont été faits à plusieurs reprises et il ne peut s'agir d'erreur technique. Par ailleurs nous n'avons aucune raison d'invoquer une exclusion de paternité.

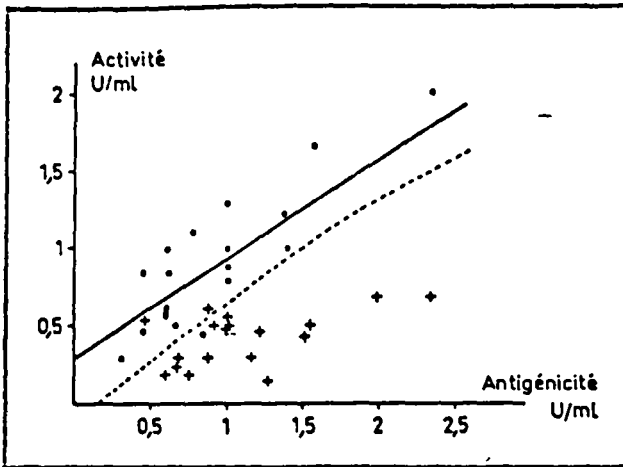


Fig. 2. — Activité coagulante et antigénicité du facteur VIII chez 20 femmes normales (●) et chez 18 conductrices certaines (+).

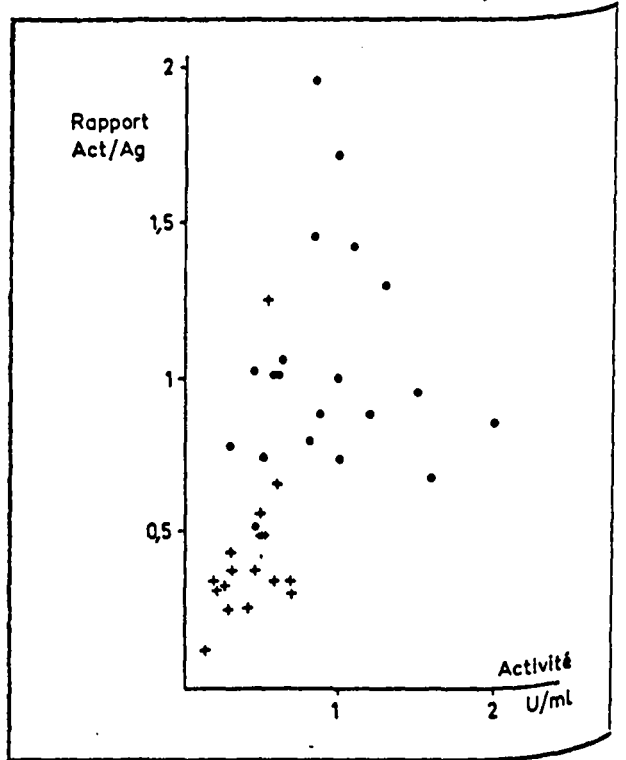


Fig. 3. — Rapport d'activité (Act) sur antigène (Ag) du facteur VIII chez des femmes normales (●) et chez des conductrices certaines (+).

TABLEAU I. — Etude comparée de l'activité coagulante (Act), de l'antigénicité (Ag) du facteur VIII et du rapport (R = Act/Ag) chez deux conductrices certaines.

	Au 3 ^e trimestre de la grossesse			Après accouchement		
	Act en U/ml	Ag en U/ml	R	Act en U/ml	Ag en U/ml	R
Mme D...	1,40	4,00	0,35	0,50	1	0,50
Mme C...	1,10	2	0,55	0,30	0,70	0,42

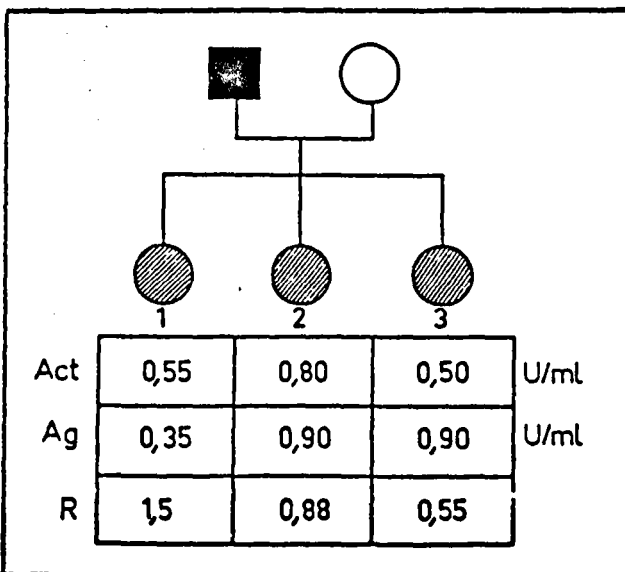


Fig. 4. — Etude de l'activité coagulante (Act) de l'antigénicité (Ag) du facteur VIII et du rapport Act/Ag (R) chez trois filles (rond hachuré) d'un hémophile A majeur (■).

Deux femmes conductrices certaines ont pu être étudiées en fin de grossesse et après accouchement (tableau I). L'activité facteur VIII est très nettement augmentée, de même que l'antigène au cours de la grossesse par rapport aux taux observés après l'accouchement, mais, quoiqu'il n'existe pas un étroit parallélisme dans les variations observées, le rapport Act/Ag reste abaissé.

3) Conductrices probables.

Les conductrices probables se répartissent en deux groupes, d'une part dix mères (un seul hémophile connu dans la famille), d'autre part seize sœurs d'hémophile (n'ayant donc que 50 % de probabilité d'être conductrices).

La comparaison de l'activité et de l'antigénicité du facteur VIII (fig. 5) des mères d'hémophiles, les place pour 5 d'entre elles (sur 10) dans la zone inférieure correspondant aux conductrices certaines. Les 5 autres se trouvent dans la zone intermédiaire où peuvent se situer aussi bien les femmes normales que les conductrices vraies (dont 1 à la limite de confiance).

En ce qui concerne les seize sœurs d'hémophiles, huit d'entre elles se trouvent dans la zone des conductrices, deux à la limite de confiance, quatre

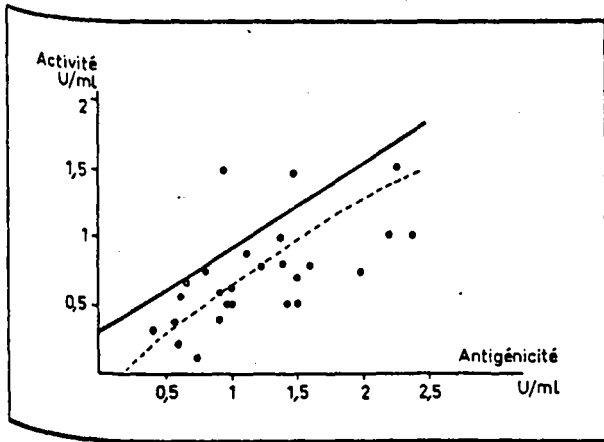


Fig. 5. — Activité coagulante et antigénicité du facteur VIII chez des conductrices probables, mères de 1 hémophile (●) ou sœurs d'hémophile (○).

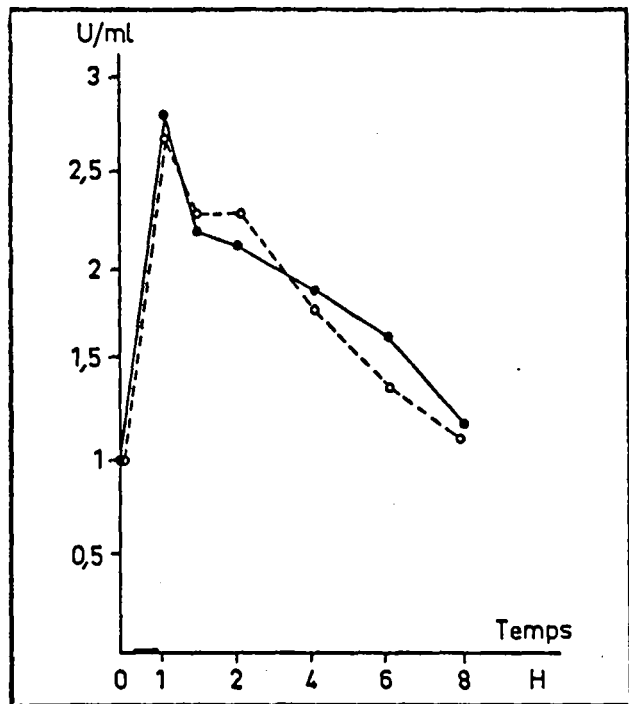


Fig. 6. — Variation de l'activité coagulante (—) et de l'antigénicité du facteur VIII (---) après exercice musculaire.

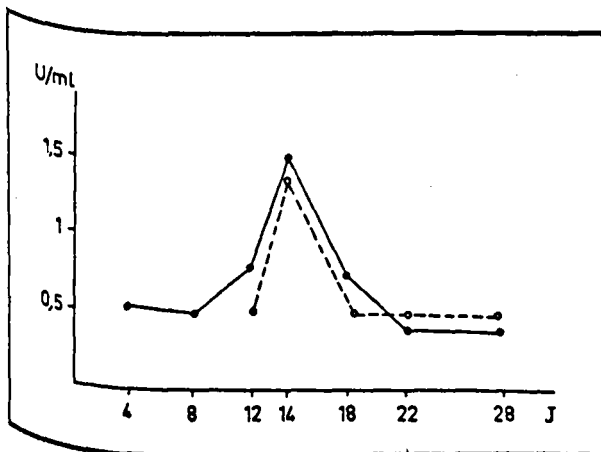


Fig. 7. — Variation de l'activité coagulante (—) et de l'antigénicité du facteur VIII (---) au cours du cycle menstruel.

TABLEAU II. — Mesure de l'activité et de l'antigène facteur VIII chez 16 femmes normales entre le 7^e et le 9^e mois de la grossesse.

N°	Activité F. VIII (en unité/ml)	Antigène F. VIII (en unité/ml)	Rapport ACT/AG
1			
2	1.85	2.00	0.92
3	2.50	1.90	1.31
4	1.90	1.80	1.05
5	2.50	2.00	1.25
6	2.00	1.80	1.11
7	1.65	2.50	0.66
8	1.25	1.70	0.73
9	1.90	0.70	2.71
10	3.75	2.00	1.87
11	4.10	5.00	0.82
12	1.90	1.30	1.46
13	2.45	2.60	0.94
14	2.20	4.30	0.51
15	3.50	2.20	1.59
16	1.96	1.36	1.44
	6.50	9.25	0.70
Moyenne	2.62	2.65	0.98

dans la zone intermédiaire et deux au-dessous de la droite de régression. Ces six dernières peuvent être considérées comme certainement normales.

4) Femmes normales.

— Epreuve d'effort.

Une femme normale a effectué un exercice physique représenté par une course de 1,250 km. La figure 6 montre l'augmentation parallèle de l'activité et de l'antigène facteur VIII dans les heures qui suivent cet effort. Le rapport activité sur antigène reste constant et toujours dans les limites de la normale.

— Cycle menstruel.

Les modifications de l'activité et de l'antigène facteur VIII ont également été étudiées au cours du cycle menstruel chez la femme normale. Une augmentation importante et transitoire de l'activité du facteur VIII est observée au milieu du cycle. Mais à cette augmentation correspond une élévation identique de l'antigène si bien que le rapport entre les deux reste identique (fig. 7).

— Grossesse.

Le facteur VIII a été dosé par les deux techniques chez 16 femmes normales entre le 7^e et le 9^e mois de la grossesse (tableau II). Le taux de l'activité est très augmenté allant de 1,25 à 6,5 unités par

ml avec un taux moyen de 2,62 unités tandis que l'antigène varie de 0,70 à 9,25 unités avec un taux moyen de 2,65 unités. Le rapport moyen activité sur antigène est alors de 0,98 c'est-à-dire normal. Cependant, si pour 13 femmes le rapport moyen se situe effectivement dans la zone normale, pour les 3 autres le rapport moyen est respectivement de 0,51, 0,66 et 0,70, c'est-à-dire dans une zone intermédiaire où il est possible de trouver aussi bien des conductrices que des femmes normales.

DISCUSSION

La comparaison des taux d'activité et d'antigène facteur VIII nous a ainsi permis de mettre en évidence des différences très nettes chez 16 conductrices certaines (sur 18, soit 88 % des cas) par rapport aux femmes normales. Cette méthode permet donc d'approcher beaucoup plus du dépistage systématique des conductrices vraies, que le simple dosage de l'activité facteur VIII, qui ne permettrait que de dépister à peine 50 % d'entre elles. Nos résultats dans l'ensemble concordent avec les données de la littérature (2, 6, 13, 14).

Il n'empêche que dans presque 1 cas sur 6, les conductrices ne peuvent être distinguées par cette méthode des femmes normales. Il est certes possible que puissent entrer en jeu les aléas techniques du dosage des deux variables entrant dans le calcul du rapport considéré. Le perfectionnement des techniques permettra sans doute de réduire cette erreur. Il y aura peut-être lieu d'invoquer des influences génétiques s'il s'avérait que l'on retrouve d'autres familles comme la nôtre, où les 3 filles d'un hémophile ont des rapports activité/antigénicité anormalement élevés.

Il y a lieu aussi de tenir compte de la labilité du taux de facteur VIII (aussi bien activité qu'antigénicité) au cours de diverses circonstances physiologiques : exercice musculaire, cycle menstruel, grossesse...

L'augmentation de l'activité du facteur VIII lors de l'effort musculaire est bien connue (7, 8, 9, 11, 12, 17). Récemment des auteurs tels que Bennet (2) et Prentice (15) ont pu également mettre en évidence une augmentation parallèle de l'antigène facteur VIII. Nous-mêmes l'avons constaté chez une jeune femme après exercice musculaire. Mais en fait l'activité et l'antigène facteur VIII augmentent dans les mêmes proportions et le rapport des deux données est peu modifié.

Différentes hormones sont aussi susceptibles de modifier le facteur VIII : l'adrénaline, la cortisone,

les progestatifs (5, 7, 11, 12, 15). On sait par ailleurs que le taux du facteur VIII peut varier chez la femme au cours du cycle menstruel mais il ne semble pas qu'une étude systématique ait été faite à ce sujet. Nous avons observé dans un cas une augmentation parallèle transitoire de l'activité et de l'antigène facteur VIII au cours du cycle menstruel ce qui fait que le rapport activité sur antigène facteur VIII n'a pas été modifié. Il est donc vraisemblable (bien que ce fait mérite d'être confirmé) qu'il n'y a pas lieu de tenir compte de l'incidence du cycle menstruel lors de la recherche des conductrices.

Beaucoup mieux connue est l'augmentation du facteur VIII en fin de grossesse, qui se retrouve à la fois, chez les femmes normales, chez les conductrices et chez les femmes atteintes de maladie de Willebrand (16, 18, 19). De ce fait il était pratiquement impossible jusqu'à présent de faire le diagnostic de conductrice chez une femme enceinte en se basant sur le seul taux de facteur VIII.

La comparaison du taux d'activité et d'antigène semble là encore apporter un net progrès dans le dépistage des conductrices. En effet Bennett et Ratnoff (1) ont pu constater des variations parallèles des deux taux au cours de la grossesse chez des conductrices certaines, ce qui fait que le rapport reste abaissé. Nous-mêmes l'avons constaté chez deux de nos conductrices vraies.

Il n'empêche que Van Royen et Tencate (20) étudiant 15 femmes normales en fin de grossesse trouvent dans l'ensemble une augmentation plus importante de l'antigène que de l'activité ce qui diminue d'autant le rapport Act/Ag. Nous-mêmes chez 16 femmes normales enceintes, entre le 7^e et le 9^e mois de la grossesse, avons observé un rapport normal chez 13 d'entre elles mais chez 3 femmes il était abaissé au point que l'on aurait pu les considérer comme conductrices (tableau II). La grossesse augmente donc l'imprécision du dépistage biologique des conductrices et il y a lieu de se méfier des résultats observés en cours de grossesse.

Au terme de ce travail nous pouvons conclure que la mesure de l'antigène facteur VIII associée au dosage de son activité coagulante permet dans la majorité des cas de dépister les conductrices de l'hémophilie A. Cette méthode ne semble devoir être influencée ni par l'exercice musculaire, ni par l'action de certaines hormones car à l'augmentation du facteur VIII produite par ces différents facteurs correspond toujours une augmentation parallèle de l'antigène. Une réserve est cependant à faire chez la femme enceinte car il apparaît que dans certains cas, l'augmentation de l'antigène soit supérieure à celle de l'activité du facteur VIII ce qui risque de donner un excès de résultats positifs.

DETECTION OF THE CARRIER STATE FOR CLASSIC HEMOPHILIA
BY COMPARATIVE ASSAY OF FACTOR VIII ACTIVITY
AND FACTOR VIII ANTIGEN

by A. PARQUET-GERNEZ, Cl. MAZURIER and M. GOUEMAND

Laboratoire d'Hémostase du Centre Régional de Transfusion sanguine de Lille,
21, rue C. Guérin, 59000 Lille (France)

(Path. Biol., 1974, 22, suppl., 37-42)

SUMMARY. — Factor VIII activity/antigenicity ratio was greatly reduced ($\leq 0,5$) in the majority of the proven carriers (16/18); thus it allows to pick up them with a probability greater than that deduced from factor VIII activity alone.

Muscular exercise, menstrual cycle, didn't modify this ratio whose the two parameters increased together.

Of sixteen normal pregnant women, thirteen had a ratio in the normal range but in three cases it was lowered in relation to a greater increase of the antigenicity. Nevertheless in two proven carriers, during pregnancy or not, the ratio was always about 0,5.

Thus it seems that carrier's diagnosis could be ascertained with a probability rate near 90 % when both the factor VIII immunological determination and clotting activity were performed.

Key-words : Factor VIII. — Carriers of classic hemophilia. — Immunologic assay for factor VIII. — Late pregnancy. — Exercise.

RÉFÉRENCES

1. BENNET B., RATNOFF O. D., 1972. — Changes in anti-hemophilic factor (AHF, factor VIII) procoagulant activity and AHF like antigen in normal pregnancy and following exercise and pneumoencephalography. *J. Lab. clin. Med.*, 80, 256.
2. BENNETT B., RATNOFF O. D., 1973. — Detection of the carrier state for classic hemophilia. *New Engl. J. Med.*, 7, 432.
3. BERGNA L. J., 1960. — A simple method for the assay of factor VIII. *Blood*, 15, 637.
4. BOUMA B. N., 1973. — Immunological studies of anti-haemophilic factor A (factor VIII). *Neth. J. Med.*, 16, 94.
5. CROWELL E. B. Jr, CLATENOFF D. V., KIEKHOFFER W., 1971. — The effect of oral contraceptives on factor VIII levels. *J. Lab. clin. Med.*, 77, 551.
6. DENSON K. W. E., INGRAM G. I. C., 1973. — Antigen/Biological activity ratio for factor VIII. *Lancet*, 157.
7. EGERBERG O., 1963. — Changes in the activity of anti-hemophilic A factor (factor VIII) and in the bleeding time associated with muscular exercise and adrenalin infusion. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 15, 539.
8. GOUEMAND M., FOUCAUT M., HABAY D., PARQUET-GERNEZ A., 1964. — Les variations du taux de facteur VIII au cours de l'exercice musculaire. Essai d'interprétation. *Nouv. Rev. franç. Hémat.*, 4, 315.
9. IKKALA E., MYLLYLÄ G., SARAJASH S. S., 1963. — Haemostatic changes associated with exercise. *Nature (Lond.)*, 199, 459.
10. LAUREL C., 1966. — Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analyt. Biochem.*, 15, 45.
11. MANUCCI P. M., CAPITANIO A., RUGGERI Z. M., 1973. — Stress, hormones and factor VIII. In : Haemophilia (Ed. F. Ala and K. W. E. Denson). *Excerpta Med. (Amst.)*, 11.
12. MEYER D., DRAY L., ALLAIN J. P., LARRIEU M. J., 1972. — Le facteur VIII. Biologie, physiologie, pathologie et génétique. *Path. Biol.*, 20, 607-623.
13. MEYER D., LAVERGNE J. M., LARRIEU M. J., 1972. — Cross-reacting material in congenital factor VIII deficiencies (Haemophilia A and Von Willebrand's disease). *Thrombos. Res.*, 1, 183-196.
14. MEYER D., SITAR G. M., ALLAIN J. P., LARRIEU M. J. — Carrier detection of hemophilia A : an unsolved problem. (A paraître).
15. PRENTICE C. R. M., FORBES C. D., SMITH S. M., 1972. — Rise of factor VIII after exercise and adrenalin infusion, measured by immunological and biological techniques. *Thrombos. Res.*, 1, 493.
16. PRESTON A. E., 1964. — The plasma concentration to factor VIII in the normal populations. I. Mothers and babies at birth. *Brit. J. Haemat.*, 10, 110.
17. RIZZA C. R., EIPE J., 1971. — Exercise, factor VIII and spleen. *Brit. J. Haemat.*, 20, 629.
18. STRAUSS H. S., DIAMOND L. K., 1963. — Elevation of factor VIII (antihemophilic factor) during pregnancy in normal persons and in a patient with Von Willebrand's disease. *New Engl. J. Med.*, 269, 1251.
19. TODD M. E., THOMPSON J. H. Jr, BOWIE E. J., OWEN C. P. Jr., 1965. — Changes in blood coagulation during pregnancy. *Mayo Clin. Proc.*, 40, 370.
20. VAN ROYEN E. A., TENCATE J. W., 1973. — Antigen/biological activity ratio for factor VIII in late pregnancy. *Lancet*, 2, 449.
21. ZIMMERMAN T. S., RATNOFF O. D., LITTELL A. S., 1971. — Detection of carriers of classic hemophilia using an immunologic assay for antihemophilic factor (factor VIII). *J. clin. Invest.*, 50, 255.

Les premières conclusions de cette étude se rapportent aux résultats obtenus chez les femmes normales. Nous avons noté une grande variabilité des taux de FVIII:C et de FVIII R:Ag et même du rapport de ces deux valeurs. Néanmoins, il nous est apparu qu'après une épreuve d'effort, comme lors du cycle menstruel ou en fin de grossesse, le taux de VIII R:Ag augmente parallèlement à celui du VIII:C et que le rapport reste relativement constant. Si quelques publications seulement avaient déjà fait état des variations du FVIII R:Ag après exercice musculaire (BENNETT et RATNOFF : 662, PRENTICE et al. : 663), ces résultats sont maintenant tout à fait confirmés par de nombreux travaux, récemment complétés par le dosage du VIII C:Ag, qui prouvent que dans la plupart des circonstances physiologiques, le taux de facteur VIII et de facteur vWf sont bien corrélés. Un article relativement récent (MANDALAKI : 664) fait également état des variations du FVIII:C au cours du cycle menstruel alors que SIMONE et al. (665) n'avaient fait auparavant aucune relation entre les fluctuations journalières du VIII:C et la période menstruelle.

En ce qui concerne les résultats chez les conductrices certaines, nous avons montré qu'il existe chez elles, un rapport VIII:C/VIII R:Ag inférieur à celui trouvé chez les femmes normales, dans 88 % des cas. On explique ce phénomène par le fait que les conductrices n'ont qu'un seul de leurs 2 chromosomes X capables de synthétiser du FVIII alors qu'elles peuvent, n'ayant aucune anomalie au niveau de leurs autosomes, synthétiser normalement le FvWf, détecté par son antigène: le FVIII R:Ag. Nos résultats, bien qu'ayant été obtenus à partir d'échantillonnages assez faibles puisque constitués par 18 conductrices certaines et 20 femmes normales, sont en accord avec les études publiées depuis à partir d'un plus grand nombre de cas puisque les pourcentages de conductrices certaines ayant un rapport différent de ceux obtenus dans une population de femmes normales varient, selon les études, entre 72 et 92 % (RATNOFF et JONES : 666). Il faut souligner que la certitude du diagnostic ne sera jamais absolue car le phénomène de "lyonisation", qui désigne l'inactivation au hasard d'un des 2 chromosomes X, dans chaque cellule somatique femelle, à un stade précoce du développement embryonnaire, explique que certaines conductrices ont une synthèse tout à fait normale du FVIII, puisqu'aucun de leurs chromosomes X porteur de la tare ne s'est exprimé, et que par conséquent, elles ont un rapport VIII:C/VIII R:Ag identique à celui trouvé chez les femmes normales. C'est là, également, qu'on peut trouver l'expli-

cation à l'existence de certains cas d'hémophilie féminine chez les femmes dont le chromosome X normal ne s'est pas exprimé et qui ne synthétisent donc pas le FVIII, tout comme les hémophiles n'ayant qu'un seul chromosome X, porteur de la tare. Cependant, à l'heure actuelle, grâce aux progrès des techniques de dosage du FVIII R:Ag, à l'utilisation des techniques statistiques plus adaptées, et à l'introduction de données généalogiques dans les calculs de probabilité, ainsi que le recommande l'organisation mondiale de la santé : AKHMETELI et al. :667 , GRAHAM :668 , BARROW et al. :669), on peut, à partir de l'analyse de 3 échantillons de sang différents, établir dans certains laboratoires un diagnostic très satisfaisant de conductrice d'hémophilie. Pour notre part, nous espérons bientôt pouvoir analyser l'ensemble des résultats que nous avons acquis, ces dernières années, en dosant par deux techniques le VIII:C, en 1 et 2 temps (p.93) et le VIII R:Ag, par électroimmunodiffusion quantitative et par méthode immunoenzymatique (voir p. 56 et ci-dessous), afin de vérifier si, notamment, ainsi que viennent de l'assurer FISHMAN et al. (670), la technique immunoenzymatique améliore la discrimination entre conductrices et femmes normales.

IV. DOSAGE DE L'ANTIGENE LIE AU FACTEUR VIII PAR LA TECHNIQUE ELISA. INTERET DANS L'ETUDE DE LA MALADIE DE WILLEBRAND

C'est en 1976, époque à laquelle n'étaient utilisés, pour le dosage du VIII R:Ag, que la technique d'électroimmunodiffusion quantitative, la technique d'inhibition d'hémagglutination et deux types de dosage radio-immunologiques l'un en phase liquide, l'autre en phase solide (voir p.57), que parut le premier article concernant la possibilité de doser le VIII R:Ag par une technique immunoenzymatique (BARTLETT et al. : 671). C'est cette même année que nous avons travaillé à la mise au point d'une technique analogue avec pour but :

- d'obtenir une sensibilité meilleure que celle obtenue par l'électroimmunodiffusion quantitative, ce que n'obtenaient pas BARTLETT et al.,

- d'avoir une technique qui ne soit pas dépendante de la mobilité électrophorétique, tout comme les dosages radioimmunologiques qui présentent néanmoins certaines contraintes, car on commençait alors à montrer que dans certaines variantes de la maladie de Willebrand (voir p.64) il y a une augmentation de la mobilité électrophorétique du VIII R:Ag.

En 1977 nous avons publié la technique que nous avons mise au point, en spécifiant déjà une variante nous permettant d'obtenir une sensibilité $1,5 \times 10^{-3}$ U/ml. A la suite de deux publications américaines de 1979 consacrées à deux techniques immunoenzymatiques (voir p.56), nous avons, plus tard, dans une courte note, rappelé sa sensibilité et sa fiabilité. Nous avons, en outre, noté que cette technique, tout comme les techniques radioimmunologiques, est intéressante lors de l'étude du VIII R:Ag de malades vWD, d'une part parce qu'elle est beaucoup plus sensible que la technique d'électroimmunodiffusion quantitative de LAURELL et d'autre part, parce qu'elle peut, quand ses résultats sont inférieurs à ceux obtenus avec le "laurell", être un élément orientant vers la recherche d'une anomalie qualitative du F vWf.

DOSAGE DE L'ANTIGÈNE LIÉ AU FACTEUR VIII PAR LA TECHNIQUE ELISA. INTÉRÊT DANS L'ÉTUDE DE LA MALADIE DE WILLEBRAND

Claudine MAZURIER, Armelle PARQUET-GERNEZ, M. GOUDEMANT

Centre Régional de Transfusion Sanguine,
21, rue Camille-Guérin, 59012 Lille Cedex (France)

RÉSUMÉ

La technique ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) est appliquée au dosage de l'antigène lié au facteur VIII (VIII R : Ag). Le VIII R : Ag est, tout d'abord, pris en « sandwich » entre des anticorps de lapin anti-facteur VIII humain insolubilisés dans des tubes de polystyrène et des mêmes anticorps liés à de la peroxydase par action de la glutaraldéhyde ; son dosage proprement dit se fait par l'addition d'un substrat chromogénique de l'enzyme et mesure de la coloration au spectrophotomètre.

Une étude préliminaire permet de juger de la sensibilité, de la reproductibilité et de la spécificité de la technique. Les résultats qu'elle apporte, comparés à ceux de la technique électro-immunologique classique (EIA), donnent de précieux renseignements sur les variations quantitatives et qualitatives du facteur VIII R : Ag, dans certains types de maladie de Willebrand. Deux cas significatifs sont notamment décrits : l'un a un taux de VIII R : Ag apparemment normal en EIA mais diminué en ELISA, la discordance étant vraisemblablement due à une augmentation de la mobilité électrophorétique ; l'autre, bien que possédant un taux de VIII R : Ag normal par les deux techniques, présente des anomalies caractéristiques de la maladie de Willebrand.

MOTS CLÉS MEDLINE : Maladie de Von Willebrand * Immunologie - Facteur VIII * Immunologie - Technique d'immuno-enzyme (technique ELISA).

Matériel et Méthodes

Les échantillons de plasma analysés proviennent de sang veineux prélevé en tube plastique sur citrate de sodium à 3,8 p. 100 à raison de 1 volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang. Le plasma standard utilisé pour les différents dosages (VIII R : Ag, VIII : C et VWF) est un mélange de plasmas citratés de 20 témoins conservé durant moins d'un mois à -20°C.

MAZURIER C., PARQUET-GERNEZ A., GOUDEMANT M., 1977.
— Dosage de l'antigène lié au facteur VIII par la technique ELISA. Intérêt dans l'étude de la maladie de Willebrand. Path. Biol., 25, suppl., 18-24.

SUMMARY

ENZYMELINKED IMMUNOABSORBENT ASSAY OF FACTOR VIII-RELATED ANTIGEN. INTEREST IN STUDY OF VON WILLEBRAND'S DISEASE. — Factor VIII-related antigen is measured by ELISA as follows : Factor VIII R : Ag is first « captured » between rabbit antibodies to human factor VIII R : Ag adsorbed in polystyrene tubes, and conjugate (peroxydase-labelled rabbit antibodies). A chromogenic enzyme substrate is then added and absorbance measurement allows subsequent assay.

This method is sensitive, reproducible and specific. The comparison between the results obtained by this enzyme immuno-assay and the electro-immunodiffusion assay (EIA) is interesting for the study of quantitative and qualitative variations of F VIII R : Ag in von Willebrand's disease. Two observations of von Willebrand variants are described in detail : VIII R : Ag plasma level of the first one is normal using EIA but decreased using ELISA, its electrophoretic mobility is increased ; in the second case we found typical anomalies of von Willebrand except the VIII R : Ag level normal by the two methods.

MEDLINE KEY WORDS : Von Willebrand's disease * Immunology - Factor VIII * Immunology - Enzyme-linked immunoabsorbent assay.

Dosage de l'activité Facteur VIII (VIII : C).

L'activité coagulante est dosée par la méthode en un temps de Soulier et Larrieu (12).

Dosage du facteur Willebrand.

Ce dosage a été effectué par une technique dérivée de la méthode de Weiss et al. (14) décrite précédemment (9).

Manuscrit reçu à la Rédaction le 20 octobre 1977.

Etude électro-immunologique de l'antigène Facteur VIII.

Le dosage du VIII R : Ag est effectué par la technique classique EIA de Laurell (8), les conditions techniques adoptées et la préparation de l'antisérum ont été précisées précédemment (10).

La mobilité électrophorétique du VIII R : Ag a été déterminée grâce à la technique d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle de Laurell (7), sur des plasmas préalablement concentrés par ultrafiltration en microconcentrateurs A-25 (Amicon, Oosterhout, Holland). Le Rf du VIII R : Ag est calculé en faisant le rapport de la distance de migration du maximum du pic de VIII R : Ag sur la distance de migration d'albumine marquée au bleu de bromophénol.

Dosage enzymo-immunologique du Facteur VIII.**Principe.**

La technique employée est une micro-méthode de dosage par ELISA (« enzyme linked immuno-sorbent assay ») où l'antigène facteur VIII est pris en « sandwich » entre des anticorps anti-facteur VIII humain. Dans un premier temps les anticorps sont insolubilisés, en excès, par fixation dans des tubes de polystyrène. Dans un deuxième temps l'antigène à doser est introduit dans les tubes et incubé pour permettre la liaison antigène-anticorps. Un lavage ultérieur permet d'éliminer toutes les protéines qui ne se sont pas liées spécifiquement aux tubes par l'intermédiaire des anticorps. Dans un troisième temps on ajoute une solution d'anticorps anti-facteur VIII marqués par une enzyme et on incube de nouveau. Enfin, après avoir éliminé tous les anticorps marqués en excès par lavage, on détermine la quantité d'enzyme fixée en ajoutant dans les tubes un substrat chromogénique de l'enzyme. La coloration développée après un temps déterminé est proportionnelle à la quantité d'anticorps marqués par l'enzyme donc à la quantité d'antigène qui s'est fixée durant la deuxième étape.

Technique.

Nous avons adapté la technique décrite, pour le dosage d'autres protéines, par Engvall et Perlmann (4).

a) Anticorps utilisés.

Les IgG d'un antisérum de lapin anti-facteur VIII humain préparé au laboratoire selon le protocole décrit précédemment (10) sont obtenues après passage sur DEAE Sephadex.

b) Insolubilisation des anticorps.

Une solution à 100 µg/ml d'IgG de lapin dans du tampon carbonate 0,05 M de pH 9,6 contenant 0,02 p. cent (w/v) d'azoture de sodium est répartie, sous un volume de 1 ml dans des tubes de 4 ml de polystyrène incubés 1 h à 37°C et conservés jusqu'au moment du dosage à + 4°C (nous avons gardé ces tubes sans inconvénients durant 1 mois dans certains cas).

c) Couplage des anticorps à l'enzyme.

L'enzyme utilisée est de la peroxydase (grade I, Boehringer, Mannheim, Deutschland). Elle est couplée aux IgG de lapin en suivant la méthode en 1 temps d'Avrameas (1) : on dissout 50 mg d'IgG de lapin anti-facteur VIII humain dans 10 ml de tampon phosphate 0,1 M de pH 6,8. On ajoute 100 mg de peroxydase et on laisse le mélange sous agitation douce pendant 30 minutes. Puis on ajoute goutte à goutte 0,6 ml de glutaraldéhyde à 1 p. cent dans l'eau. L'agitation est poursuivie pendant 2 heures à température ambiante puis le mélange est dialysé à + 4°C contre 2 fois 5 litres de tampon PBS 0,1 M pH 7. Après la deuxième nuit de dialyse on complète le volume des anticorps marqués à 100 ml en les diluant dans de la sérum-albumine à 5 p. cent (w/v) dans du tampon Tris-HCL 0,05 M pH 8 contenant 0,01 M de Mg Cl₂ et 0,02 p cent (w/v) de Na₂

La préparation d'anticorps marqués obtenue est répartie en tubes de 1 ml puis congelée à - 20°C.

d) Mode opératoire.

On lave 3 fois de suite les tubes contenant la solution d'anticorps en les remplissant de tampon PBS-tween (tampon phosphate 0,1 M, NaCl 0,14 M contenant 0,05 p. cent (v/v) de tween). On ajoute 1 ml de la solution contenant l'antigène facteur VIII : les plasmas ou préparations de facteur VIII sont dilués dans le tampon PBS-tween. Les tubes sont incubés ensuite 1 h à 37°C puis lavés de nouveau 3 fois avec le tampon PBS-tween. On ajoute ensuite 1 ml de la préparation d'anticorps couplés à la peroxydase décongelée et diluée extemporanément au dixième dans le tampon PBS-tween. On incube de nouveau les tubes 1 h à 37°C. Enfin, dans chaque tube lavé 3 fois avec du tampon PBS-tween on ajoute 1 ml de la solution contenant le substrat révélant l'enzyme préparée extemporanément en ajoutant 10 µl d'eau oxygénée à 30 volumes à 100 ml de tampon phosphate 0,02 M pH 6 contenant 80 mg d'acide 5-amino-salicylique. Une coloration brun-violacée se développe dans les tubes. Une demi-heure après on stoppe la réaction enzymatique en alcalinisant le milieu par addition de 0,1 ml de NaOH 1M.

e) Calcul du taux de VIII R : Ag.

On mesure ensuite la DO à 449 nm des solutions correspondant aux différentes dilutions du plasma standard et des plasmas à tester. On établit une droite d'étalonnage sur du papier millimétré en portant en abscisse la concentration en VIII R : Ag et en ordonnée la DO à 449 nm. Le taux de VIII R : Ag se détermine en faisant la moyenne des valeurs obtenues pour trois dilutions des solutions à doser en se rapportant à la droite d'étalonnage obtenue avec le plasma témoin analysé à 8 dilutions différentes.

f) Variante.

Un autre substrat chromogénique de la peroxydase, l'orthophénylène diamine a été utilisé au cours de notre étude. La solution substrat se prépare alors en dissolvant 40 mg d'orthophénylène diamine dans 100 ml de tampon phosphate citrate pH 5,0 additionnés de 10 µl d'eau oxygénée à 30 volumes. Le chromophore obtenu est de couleur jaune ; les mesures de DO nécessaires au calcul du taux de VIII R : Ag sont faites à 415 nm.

Résultats**Etalonnage.**

La figure 2 représente la courbe d'étalonnage établie à partir de la densité optique à 449 nm des solutions de chromophore obtenues en étudiant diverses dilutions d'un pool de plasmas témoin et le tampon PBS seul (témoin blanc). Il y a proportionnalité entre la DO et le taux d'antigène lié au facteur VIII pour des concentrations de F VIII R : Ag inférieures à 5×10^{-2} U/ml.

Sensibilité.

La droite d'étalonnage montre qu'il est possible de mesurer une coloration correspondant à $0,75 \times 10^{-2}$ U/ml de VIII R : Ag. Cette technique est donc au moins 10 fois plus sensible que la méthode d'immunoélectrophorèse quantitative. Elle permet de doser, en se fondant sur la moyenne des résultats de trois dilutions différentes, des taux de VIII R : Ag supérieurs à 0,037 U/ml (plasma analysé pur, et dilué au 1/2 et au 1/5).

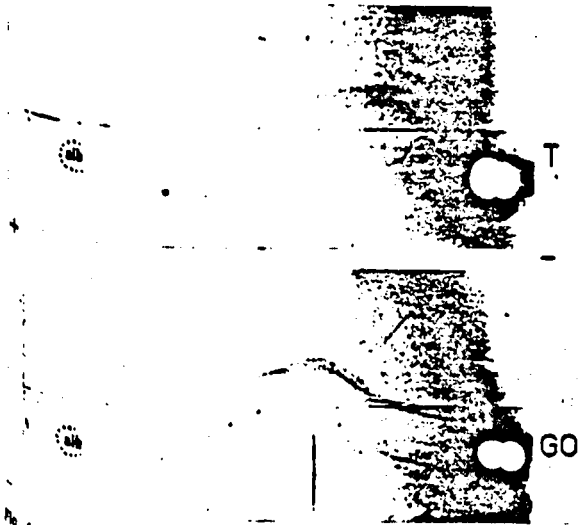


Fig. 1. — Immunoelectrophorèses bidimensionnelles contre un antiserum de lapin anti-facteur VIII humain de plasma témoin (T) et de plasma d'une malade atteinte de maladie de Willebrand (GO). De l'albumine (alb) colorée au bleu de bromophénol est utilisée comme repère.

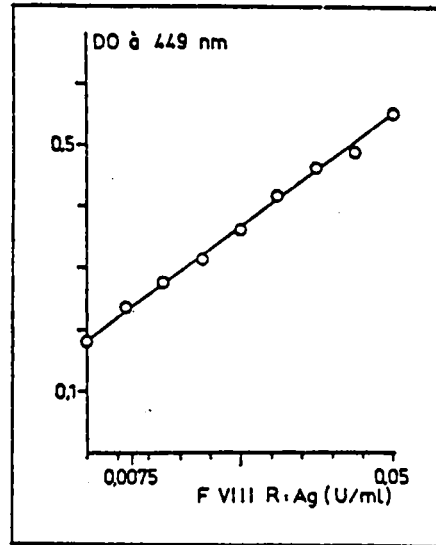


Fig. 2. — Droite d'étalonnage établie en reportant la densité optique (DO.) à 449 nm après addition d'acide 5 amino-salicylique, en fonction du taux d'antigène lié au facteur VIII (F VIII R : Ag) de différentes dilutions d'un pool de plasmas témoins.

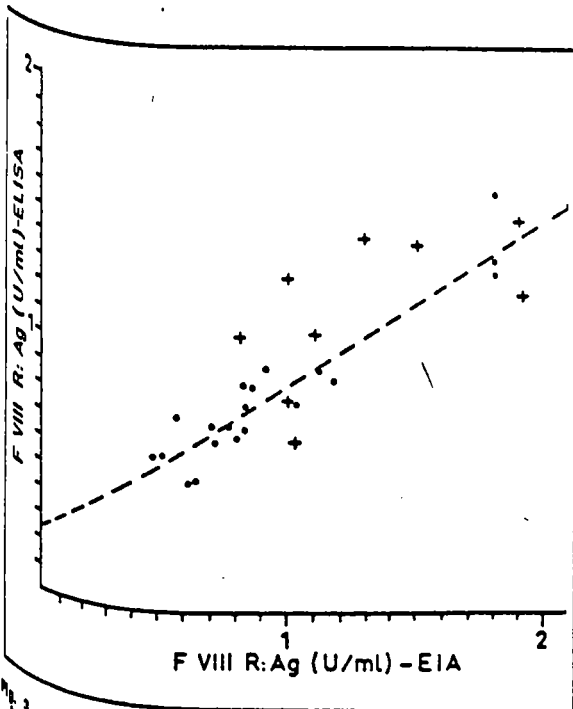


Fig. 3. — Corrélation entre les résultats des dosages de VIII R : Ag effectués par EIA (Electroimmunodiffusion Assay) et par ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) sur des plasmas de témoins (.) et d'hémophiles A majeurs (+).

Reproductibilité.

Les plasmas à doser sont analysés à trois dilutions différentes (pour les taux de VIII R : Ag normaux : 1/20, 1/40 et 1/80). Dans le tableau I nous avons reporté les moyennes et déviations standard calculées à partir des résultats de 10 dosages successifs effectués sur un plasma normal conservé congelé.

TABLEAU I. — Taux d'antigène lié au facteur VIII (F VIII R : Ag) déterminé lors de 10 dosages successifs effectués, par la technique ELISA, sur trois dilutions d'un même plasma de sujet témoin.

Dilution du plasma	F VIII R : Ag en U/ml	
	Moyenne	Ecart-type
1/20	0,56	0,1
1/40	0,54	0,07
1/80	0,60	0,09

Spécificité.

Pour étudier la spécificité de notre technique de dosage nous l'avons appliquée à l'étude de seize sujets atteints de maladie de Willebrand sévère dont le plasma ne donne pas de pic de précipitation décelable par la méthode de Laurell (les échantillons sont représentés sur la figure 4 dans la zone correspondant à des taux < à 0,1 U/ml de VIII R : Ag sur l'axe des abscisses). Pour dix d'entre eux le VIII R : Ag est compris entre 0,16 et 0,07 U/ml ; pour six d'entre eux le taux ne peut être déterminé précisément, il est inférieur à 0,0075 U/ml puisque dans les tubes correspondant à ces plasmas non dilués, la densité optique n'est pas sensiblement différente de celle du témoin blanc. Ces valeurs sont significativement diminuées par rapport aux taux trouvés sur des plasmas normaux puisque dans un échantillon de 20 témoins, la valeur moyenne est de 0,83 et l'écart type de 0,29.

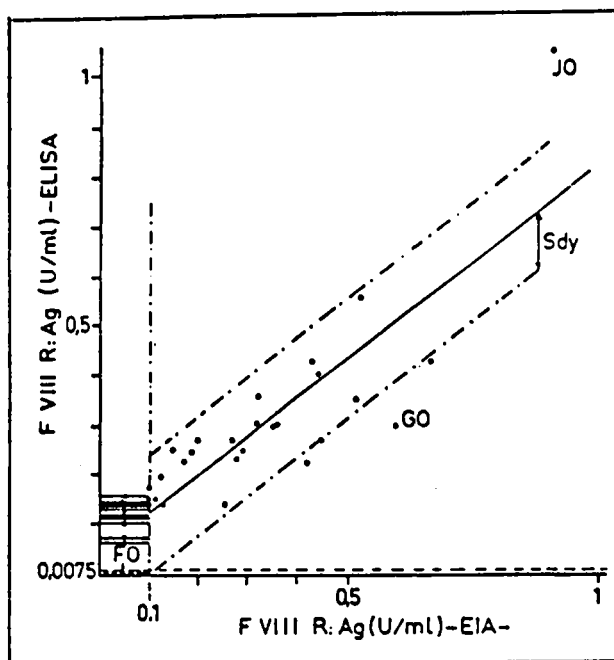


Fig. 4. — Corrélation entre les résultats des dosages de VIII R : Ag effectués par EIA et ELISA sur quarante-trois plasmas de sujets atteints de maladie de Willebrand.

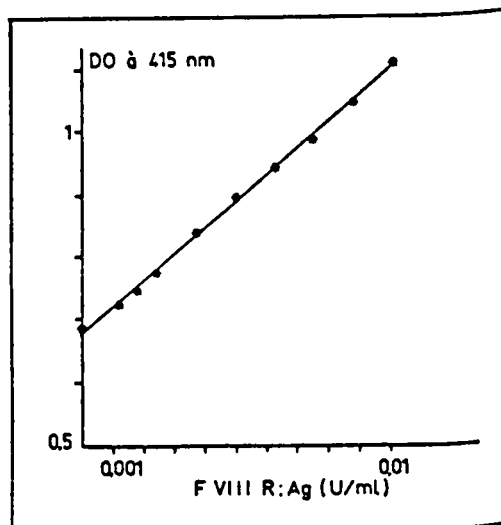


Fig. 5. — Droite d'étalonnage établie en reportant la densité optique (DO) à 415 nm après addition d'ortho-phénylène diamine, en fonction du taux d'antigène lié au facteur VIII (F VIII R : Ag) de différentes dilutions d'un pool de plasmas témoins.

Corrélation avec la méthode d'immunoélectrophorèse quantitative.

Sur la figure 3, nous avons reporté les résultats trouvés par la technique de Laurell (EIA) et par notre technique ELISA, sur des plasmas normaux et d'hémophiles A majeurs. Pour les 20 plasmas de sujets témoins étudiés, la droite de régression est tracée, le coefficient de corrélation linéaire r de 0,88 est significatif même au seuil de 99 % d'après la table de Fisher. Les moyennes des taux VIII R : Ag des 10 plasmas d'hémophiles analysés sont de 1,41 (EIA) et 1,26 (ELISA), les écarts types de 0,54 (EIA) et 0,42 (ELISA); le coefficient de corrélation entre les valeurs obtenues par les deux techniques de dosage est significatif au seuil de 95 %.

Application à l'étude de la maladie de Willebrand.

Etude générale.

Le VIII R : Ag de quarante-trois plasmas de sujets pour lesquels le diagnostic de maladie de Willebrand a été établi à la fois sur des critères cliniques et biologiques (association d'au moins 2 perturbations des analyses suivantes : détermination du temps de saignement, de la rétention des plaquettes sur billes de verre et de l'activité coagulante du facteur VIII) a été dosé par notre technique ELISA.

Pour 19 de ces plasmas, le taux de VIII R : Ag n'est pas calculable par EIA. Trois d'entre eux donnent, lorsqu'ils sont analysés non dilués, des pics de précipitation à peine décelables, tout comme une dilution au dixième de notre pool de plasmas témoins. Sur la figure 4, on voit que leur taux de VIII R : Ag, calculé à partir des valeurs obtenues sur trois dilutions en ELISA, est respectivement de 0,17, 0,155 et 0,15 U/ml. Les seize autres plasmas ne donnent pas de pic de précipitation par la technique de Laurell, ils nous ont permis d'étudier la spécificité de notre technique ELISA (voir plus haut et cf. fig. 4). L'ensemble des résultats des examens effectués pour un des six malades (Fo...) dont le taux de VIII R : Ag se situe sous le seuil de sensibilité de notre technique de routine ELISA est reporté dans le paragraphe suivant.

Enfin, nous avons analysé les résultats des dosages de VIII R : Ag calculables aussi bien par EIA que par ELISA. Vingt-quatre échantillons sont répertoriés; par EIA la moyenne des valeurs est de 0,35, par ELISA de 0,32, l'écart type étant de 0,19 par les deux techniques. Sur la figure 4, on a la représentation graphique de la comparaison des valeurs obtenues par les deux techniques. Le coefficient de corrélation linéaire est de 0,777, il est significatif au seuil de 99 %. L'équation de la droite de régression ($y = 0,775 \times + 0,049$) et l'erreur d'estimation de Y ($Sdy = 0,12$) ont été calculées; pour trois plasmas se situant en-dessous de la limite tracée, le taux de VIII R : Ag est trouvé supérieur en EIA. Cette discordance est particulièrement marquée sur le plasma d'une malade

TABLEAU II. — Etude détaillée de trois sujets atteints de maladie de Willebrand.

Malade	Syndrome hémorragique	Temps de saignement (Ivy)	Rétention des plaquettes sur billes de verre (Bowie)	Taux de F VIII : C (U/ml)	Taux de F VIII R : Ag (U/ml)		Taux de vWF (U/ml)	Mobilité électro-phorétique du VIII R : Ag (Rf/albumine)
					EIA	ELISA		
Fo... Bernard	— Epistaxis — Hémorragies digestives — Hématrôses	> 15 mn	0 %	0,02	< 0,1	< 0,0075 $0,6 \times 10^{-3}$	< 0,05	—
Jo... Jean	— Epistaxis — Gingivorragies	14 mn	0 %	0,33 0,10	0,90	1,05	1,0	0,26
Go... Valérie	— Epistaxis — Hémorragies lors d'avulsions dentaires — Hématomes	> 20 mn	23 % 19 %	0,6 0,3	0,6 0,6	0,29	0,10	0,38
Témoins normaux		< 10 mn	> 50 %	1,00	1,00	1,00	> 0,5	0,26

(Go...) dont l'observation est reportée ci-dessous. On remarque en outre, qu'un autre cas doit être envisagé plus précisément, c'est celui de Jo... dont le taux d'antigène VIII R : Ag se situe dans les limites de la normale par ELISA comme par EIA.

Etude détaillée de 3 malades.

Dans le tableau II, nous avons regroupé l'ensemble des résultats de 3 malades (Fo..., Jo... et Go...) qui présentent un syndrome hémorragique de type cutané-muqueux et un temps de saignement allongé. Ces malades non apparentés sont les seuls membres de leur famille atteints de maladie de Willebrand ; leur observation illustre l'intérêt de la technique ELISA dans 3 cas différents.

— Bernard Fo... est un malade atteint d'une forme sévère de maladie de Willebrand. Son taux d'activité coagulante du facteur VIII a été trouvé, à maintes reprises, inférieur à 0,05 U/ml. La rétention des plaquettes sur billes de verre et son taux de facteur Willebrand sont très diminués. Son taux d'antigène lié au facteur VIII se situe en deçà de la limite de sensibilité de l'EIA et de notre technique ELISA de routine. Néanmoins, en utilisant un autre substrat chromogénique (sel. variante dans chapitre matériel et méthodes) nous obtenons une bonne proportionnalité entre la DO et des concentrations de VIII R : Ag comprises entre 1×10^{-2} et $0,15 \times 10^{-2}$ U/ml (fig. 5). Cette technique ELISA sensibilisée est nécessaire, pour l'établissement de la droite d'étalonnage, des dilutions importantes du pool de témoins (du $1/100^*$ au $1/1000^*$). Le soin à apporter à ces dilutions rend la technique plus lente, elle est donc réservée aux dosages des taux d'antigène qui ne sont pas calculables par la technique de routine (VIII R : Ag inférieur à $0,037$ U/ml). La valeur avec le plasma de Fo... est de $0,6 \times 10^{-2}$ U/ml.

— Nous reportons les résultats des examens biologiques de Jean Jo... malade qui présente un VIII : C diminué variant entre 0,10 et 0,30 U/ml selon les prélèvements, mais un taux de VIII R : Ag toujours normal par la technique EIA. La mobilité électrophorétique de son VIII R : Ag est normale. La rétention de ses plaquettes sur billes de verre a été trouvée normale à plusieurs reprises mais son taux de cofacteur Wille-

brand se situe dans les limites de la normale. La technique ELISA nous a permis de confirmer son taux normal de VIII R : Ag.

— Chez un autre malade, Valérie Go... le taux de VIII : C a été trouvé une première fois à 0,6 U/ml et sur un 2^e prélèvement, à 0,3 U/ml, le taux d'antigène VIII R : Ag par EIA est de 0,6 U/ml les deux fois. La rétention de ses plaquettes sur billes de verre est anormale. La technique ELISA apporte un élément nouveau : un taux d'antigène abaissé à 0,29 U/ml assez proche du taux de facteur Willebrand (0,1 U/ml). On note, chez cette malade, une augmentation de la mobilité électrophorétique de l'antigène lié au facteur VIII (fig. 1) qui pourrait expliquer la discordance entre les résultats de VIII R : Ag par EIA et ELISA.

Discussion

. Différentes techniques immunologiques ont été appliquées au dosage du facteur VIII R : Ag : la technique d'immunoélectrophorèse quantitative (15), l'inhibition d'hémagglutination (13), la contre-immunoélectrophorèse (5) et le dosage radioimmunologique (6). La technique ELISA, technique immunologique récente de dosage à l'aide de marqueur enzymatique, est à la fois sensible, spécifique, simple et rapide ainsi que le soulignent Bartlett et al. (2) qui, les premiers, l'ont adaptée au dosage du VIII R : Ag.

. La technique à la peroxydase que nous avons mise au point et que nous employons en routine, car elle s'est avérée spécifique, reproductible et rapide, permet de détecter $0,75 \times 10^{-2}$ U/ml de VIII R : Ag. En utilisant comme substrat de l'enzyme de l'orthophénylène diamine, nous avons même porté le seuil de sensibilité à $0,15 \times 10^{-3}$ U/ml. Dans des plasmas témoins il existe une bonne corrélation ($r = 0,88$) entre les taux d'antigène déterminés par ELISA et par EIA. Les taux de VIII

R : Ag déterminés par la technique ELISA chez les hémophiles A majeurs se situent dans les limites de la normale.

. L'application de ELISA à l'étude du plasma de 43 sujets atteints de maladie de Willebrand a présenté un double intérêt.

Tout d'abord, cette technique rend possible le dosage du VIII R : Ag chez les malades dont les taux sont inférieurs à la limite de détection du pic de précipitation en EIA ($< 0,10$ U/ml). Ainsi nous avons pu mettre en évidence chez un de nos malades qu'on peut classer sans problème dans le type I de la classification de Ekert et al. (3), Fo..., un VIII R : Ag au taux de $0,6 \times 10^{-2}$ U/ml.

De plus, la comparaison des résultats des 2 techniques, EIA et ELISA, fournit des renseignements sur l'existence éventuelle d'anomalies quantitatives ou qualitatives du VIII R : Ag. Ainsi, chez les sujets atteints de maladie de Willebrand dont le taux de VIII R : Ag est normal en EIA, on peut distinguer deux types de variants.

Le premier correspond au cas de Jean Jo..., pour lequel se posait un problème diagnostique : en effet ce malade présente, tout comme les hémophiles A mineurs, un VIII : C diminué mais un taux de VIII R : Ag normal. Mais, la confirmation à plusieurs reprises de l'allongement du temps de saignement, l'absence de rétention des plaquettes sur billes de verre et le type de réponse à l'injection de cryoprécipités autorisaient le diagnostic de maladie de Willebrand. La technique ELISA vient confirmer le taux normal de VIII R : Ag et permet d'identifier ce malade au type II de la classification de Ekert et al. (3).

Dans le deuxième cas, les résultats de la technique ELISA sont en discordance avec ceux de EIA. Il s'agit de Go... Valérie dont le taux de VIII R : Ag apparaît nettement plus faible en ELISA qu'en EIA. Ceci implique l'existence d'anomalie qualitative du VIII R : Ag. Comme la technique EIA dépend non seulement de la concentration de l'antigène mais aussi de sa charge électrique, cette discordance peut être due à l'augmentation de la mobilité électrophorétique du VIII R : Ag constatée chez la malade. Ce cas est analogue à ceux décrits récemment par Peake et Bloom (11) qui comparent les résultats de IRMA (Immuno-RadioMetric Assay) et de EIA. Ces auteurs obtiennent en effet, chez 5 malades, des taux normaux en EIA, ainsi que par la technique de contre-immunoelectrophorèse, alors que par la technique

IRMA les taux sont nettement diminués. Il apparaît donc important de pouvoir comparer les résultats des techniques tributaires de la mobilité électrophorétique, telle que l'EIA, avec ceux obtenus par des techniques qui n'en dépendent pas, telles que ELISA et IRMA, de façon à rechercher d'éventuelles anomalies qualitatives du VIII R : Ag. Ceci est particulièrement intéressant chez les malades qui paraissent avoir un taux normal de VIII R : Ag par la technique de Laurell jusqu'ici utilisée et qui étaient classés dans le type V de la classification de Ekert et al. (3).

Conclusion

L'application, au dosage de l'antigène lié au facteur VIII, de la technique ELISA s'avère intéressante à plusieurs égards :

Tout d'abord, il s'agit d'une technique facile à mettre en œuvre, simple et rapide d'exécution, reproductible et spécifique. Chez les sujets normaux, les hémophiles A et la plupart des personnes atteintes de la maladie de Willebrand, ces résultats sont en bonne corrélation avec ceux obtenus par la technique de Laurell (EIA) classiquement employée pour le dosage du VIII R : Ag.

Mais la sensibilité de cette technique est bien meilleure que celle de l'EIA, en effet, elle permet de doser des taux faibles d'antigène jusque $0,15 \times 10^{-2}$ U/ml) alors que, en EIA, le seuil de détection se situe généralement aux environs de 10×10^{-2} U/ml.

Enfin, tout comme les techniques radio-immunologiques, la technique ELISA possède également l'avantage sur l'EIA de donner des résultats indépendants de la mobilité électrophorétique de l'antigène à doser. Ceci est particulièrement important dans l'étude des formes atypiques de la maladie de Willebrand, car on sait que certains de ces sujets peuvent avoir un VIII R : Ag de mobilité électrophorétique anormale.

Ainsi, par sa simplicité d'exécution et sa supériorité sur la méthode de Laurell, la technique de dosage du VIII R : Ag par ELISA permet d'apporter des éléments intéressants dans la discussion des problèmes nosologiques que pose la maladie de Willebrand. Elle devrait aussi contribuer à préciser les caractéristiques physico-chimiques du facteur VIII.

REFERENCES

1. AVRAMIAS S., 1969. — Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugate for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, 6, 103.
2. BARTLETT A., DORMANDY K.H., HAWKEY C.H., STABLEFORTH P., VOLLER A., 1976. — Factor VIII-related antigen : measurement by enzyme immunoassay. *Brit. med. J.*, 1, 994.
3. EKERT H., FIRKIN B.C., 1975. — Recent advances in haemophilia and vWD. *Vox Sang. (Basel)*, 28, 409.
4. ENOVALL E., PERLMANN P., 1972. — Enzyme-linked immunosorbent assay. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.*, 109, 129.
5. GRALNICK H.R., COLLER B.S., 1975. — Studies of the human factor VIII/von Willebrand's factor protein. II. Identification and characterization of the von Willebrand protein. *Blood*, 46, 417.
6. HOYER L.W., 1972. — Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII). IV. Radioimmunoassay of AHF antigen. *J. Lab. clin. Med.*, 80, 822.
7. LAURELL C.B., 1965. — Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Analyt. Biochem.*, 10, 358.
8. LAURELL C.B., 1966. — Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analyt. Biochem.*, 15, 45.
9. MAZURIER C., PARQUET-GERNEZ A., GOUEMAND M., MONTREUIL J., 1975. — Contribution à l'isolement et à l'étude de la masse moléculaire du Facteur VIII humain. *Path. Biol.*, 23, Suppl., 11.
10. PARQUET-GERNEZ A., MAZURIER C., GOUEMAND M., 1974. — Dépistage des conductrices de l'hémophilie A par dosage comparatif de l'activité et de l'antigénicité facteur VIII. *Path. Biol.*, 22, Suppl., 37.
11. PEAKE I.R., BLOOM A.L., 1977. — The use of an immunoradiometric assay for factor VIII - related antigen in the study of atypical von Willebrand's disease. *Thrombos. Res.*, 10, 27.
12. SOULIER J.P., LARRIEU M.J., 1953. — Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des facteurs antihémophiliques A et B. *Sang*, 24, 205.
13. STITES D.P., HERSGOLD E.J., PERLMAN J.D., FUDENBERG H.M., 1971. — Factor VIII detection by hemagglutination inhibition. Hemophilia A and von Willebrand's disease. *Science*, 171, 196.
14. WEISS H.J., HOYER L.W., RICKLES F.R., VARMA A., ROGERS J., 1973. — Quantitative assay of a plasma factor deficient in VWD that is necessary for platelet aggregation. Relationship to factor VIII procoagulant activity and antigen content. *J. clin. Invest.*, 52, 2708.
15. ZIMMERMAN T.S., RATNOFF O.D., POWELL A.E., 1971. — Immunologic differentiation of classic hemophilia and von Willebrand's disease. *J. clin. Invest.*, 50, 244.

The Assay of Factor VIII Related Antigen by an Immuno-Enzymatic Method

Dear Sir,

We have read with interest the article by Ness and Perkins (1) on the development of an immuno-enzymatic method (ELISA), for the assay of factor VIII-related antigen (VIII R:Ag), more sensitive than the Laurell technique (EIA). These authors mention the previous work of Bartlett et al. (2) whose ELISA microtechnique is of a comparable sensitivity to the EIA method, but fail to cite our technique of which we emphasised the simplicity, reproducibility and especially the sensitivity (3).

The advantage of our technique have led us to use it routinely for the last 3 years. The correlation of the results with those of EIA is highly satisfactory. A double blind test involving 167 plasma samples from normal women or hemophilia A carriers gave a correlation coefficient of 0,91. The tests of inter or intra-assay reproducibility are equally good (Table 1). The sensitivity is at least 65 times greater than for EIA and also greater than the sensitivity of the 2 recently-published competitive immuno-enzymatic methods (1, 4). In fact in more than 200 assays we have always obtained a good linear relationship between the $A_{415 \text{ nm}}$

and the quantity of VIII R:Ag between $1,5 \times 10^{-3}$ and 10^{-3} U/ml. This sensitivity thus permits the measurement of VIII R:Ag, undetectable by EIA, in the plasma of most of patients with severe von Willebrand's disease (VWD).

Finally, as we stressed already in 1977, this technique permitted the detection of variants of VWD by the differences observed with respect to EIA. These variants, characterised by a VIII R:Ag of a higher electrophoretic mobility than normal, have since been found using radio-immunological methods which, as immuno-enzymatic methods, offer the advantage of being independent of the electrophoretic mobility of the molecules assayed.

We believe therefore that the ELISA method which has proved its sensibility, reproducibility and simplicity merits its place among the factor VIII-related antigen assay methods.

Claudine Mazurier
Armelle Parquet-Gernez
Maurice Goudemand
Laboratoire d'Hémostase
Centre Régional de Transfusion Sanguine
21, rue Camille Guérin
59012 Lille Cedex, France

Table 1 Reproducibility data. Intra and Inter-assay variations in factor VIII R:Ag level of plasma from normal donors.

	\bar{x} , U/ml	SD, U/ml	CV, %
Intra-assay (3 samples, 10 assays of each)			
Plasma 1/100	0.66	0.05	7.5
Plasma 1/200	0.39	0.04	10.3
Plasma 1/400	0.25	0.02	8.
Inter-assay (10 plasmas, 5 assays of each)			
1	1.23	0.088	7.1
2	1.18	0.080	6.8
3	0.99	0.105	10.5
4	0.89	0.099	11.0
5	1.39	0.166	11.8
6	1.81	0.144	7.9
7	1.39	0.066	4.7
8	1.55	0.099	6.3
9	1.05	0.132	12.4
10	0.91	0.074	8.1

References

- 1 Ness P M, Perkins H A. A simple enzyme-immuno assay (EIA) for factor VIII-related antigen (VIII AGN). *Thrombos Haemostas* (Stuttg) 1979; 42: 848-854.
- 2 Bartlett A, Dormandy K M, Hawkey C M, Stableforth P. Von Willebrand Factor VIII-related antigen: measurement by enzyme immunoassay. *Br Med J* 1976; 1: 994-996.
- 3 Mazurier C, Parquet-Gernez A, Goudemand M. Dosage de l'antigène lié au facteur VIII par la technique ELISA. Intérêt dans l'étude de la Maladie de Willebrand. *Path Biol* 1977; 25 suppl: 18-24.
- 4 Yorde L D, Hussey C V, Yorde D E, Sasse E A. Competitive enzyme-linked immuno assay of factor VIII antigen. *Clin Chem* 1978; 24: 1924-1927.

Received February 1, 1980 Accepted February 1, 1980

En guise de discussion, nous avons comparé dans le tableau XVII (ci-dessous) les différentes techniques immunoenzymatiques de dosage du VIII R:Ag effectuées à l'aide d'anticorps hétérologues polyclonaux. Nous pouvons également dire que cette technique, dans laquelle nous n'avons modifié que le mode de couplage de l'enzyme à l'anticorps, car nous préférons maintenant employer la technique de couplage au périodate de NAKANE et KAWAI (672), est facile à mettre en oeuvre et qu'une firme commerciale de réactifs d'hémostase l'a choisie pour proposer aux laboratoires des réactifs et techniques, adaptables aux microplaques ELISA, de dosage du VIII R:Ag et de l'antigène lié au facteur IX.

TABLEAU XVII

CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES IMMUNOENZYMATIQUES DE DOSAGE DU FVIII R : Ag, EMPLOYANT DES ANTICORPS HÉTÉROLOGUES

AUTEURS	PRINCIPE	ENZYME UTILISEE	SENSIBILITE
BARTLETT <u>et al.</u> 1976 (673)	Technique "sandwich" Type ELISA	Phosphatase alcaline	≈ 0,1 U/ml
MAZURIER <u>et al.</u> 1977	Technique "sandwich" Type ELISA	Peroxydase	0,15 x 10 ⁻² U/ml
NESS <u>et PERKINS</u> 1979 (674)	Technique enzymo-immunométrique à double anticorps	Phosphatase alcaline	0,16 x 10 ⁻² U/ml
YORDE <u>et al.</u> 1979 (675)	Technique compétitive Type CELIA	Peroxydase	5 x 10 ⁻² U/ml
HANSEN <u>et al.</u> 1981 (676)	Technique "sandwich" Type ELISA	Phosphatase alcaline	≈ 0,1 U/ml
FISHMAN <u>et al.</u> 1982 (677)	Technique "sandwich" Type ELISA	Phosphatase alcaline	1 x 10 ⁻² U/ml
CEJKA 1982 (677')	Technique "sandwich" Type ELISA	Phosphatase alcaline ou Peroxydase	3 x 10 ⁻² U/ml
BOBROW <u>et al.</u> 1982 (677'')	Technique compétitive Type CELIA	Phosphatase alcaline	0,75 x 10 ⁻² U/ml
SCHOSSLER <u>et al.</u> 1982 (677''')	Technique enzymo-immunométrique	Phosphatase alcaline	0,78 x 10 ⁻² U/ml

BU
LILLE

V MALADIE DE WILLEBRAND ACQUISE AU COURS D'UNE MALADIE DE
WALDENSTRÖM

Nous rapportons l'observation d'un homme de 66 ans dont le bilan d'hémostase préopératoire, avant biopsie d'un ganglion cervical, a permis de mettre en évidence des anomalies généralement trouvées dans la maladie de vWD. Après interrogatoire du malade et mise en évidence d'une activité inhibitrice du VIII R:RCo dans son sérum, le diagnostic de maladie de Willebrand acquise est avancé. La recherche immunoélectrophorétique d'immunoglobulines anormales dans le plasma du patient, qui pouvaient être à l'origine d'une activité anticorps, conduit à la découverte d'une macroglobulinémie de type de Waldenström à IgM Kappa. Cependant, la purification des immunoglobulines permet de constater que les IgM monoclonales n'ont pas d'activité inhibitrice mais que l'effet inhibiteur se retrouve dans une fraction d'IgG purifiées. Le caractère acquis des anomalies est confirmé, par la suite, car en quelques mois le bilan d'hémostase se normalise.

Acquired von Willebrand's Syndrome in the Course of Waldenström's Disease

Claudine Mazurier, Armelle Parquet-Gernez, Jacques Descamps, Francis Bauters* and Maurice Goudemand

From the Laboratoire d'Hémostase, Centre Régional de Transfusion Sanguine, Lille, France

Keywords

Acquired von Willebrand's syndrome - Auto-antibody - Waldenström's disease

Summary

Acquired von Willebrand's syndrome with a regressive evolution is described in a 66 year old man with Waldenström's disease. The inhibitor electively directed against Ristocetin cofactor activity has been demonstrated, active in vitro after incubation at 37°C. Serum fractionation showed that the inhibitor was indeed composed of the monoclonal IgM and subsequent purification that the inhibitor was of IgG in nature. The results permit its classification as an auto-antibody.

Introduction

About twenty cases of acquired hemorrhagic syndrome resembling von Willebrand's disease (vWD) have been described in the last few years (1-15). All these patients had quantitative abnormalities of factor VIII/von Willebrand factor (F VIII/vWF) with a diminution, in variable proportions, of factor VIII procoagulant activity (VIII:C), factor VIII-related antigen (VIII R:Ag) and ristocetin cofactor activity (VIII R:RCF). However, the absence of any clinical or familial history of vWD disease and the regressive evolution of the disorder are incompatible with the diagnosis of congenital vWD. In this paper we describe a new case of acquired vWD in a patient with Waldenström's disease. An inhibitor against VIII R:RCF is present in the IgG fraction of his serum.

Materials and Methods

Case Report and Laboratory Data

A 66 year old man with no clinical or familial history of abnormal hemostasis was admitted to the hospital in December 1978 with a hemorrhagic syndrome with severe epistaxis. Lympho-adenopathy and thrombocytopenia were discovered. Before biopsy of a cervical lymph node, a partial thromboplastin time was investigated: the activated partial thromboplastin time (APTT) was prolonged (patient: 52 sec, control: 37 sec) and VIII:C level reduced (28 U VIII:C/Kg b. wt). The biopsy was thus performed after infusion of lyophilised factor VIII concentrates (28 U VIII:C/Kg b. wt). The same dose of factor VIII was given every 12 h for several days but did not prevent abundant bleeding at the operation wound. The various hematological investiga-

tions showed that the patient was suffering from Waldenström's macroglobulinemia with the presence of IgM K (47.6 g/l) and thus BUSULFAN* was administered. The hemorrhagic syndrome disappeared after 15 days and it has not recurred since.

2. Diagnostic Methods

Most of the techniques used were those classically described (16). Factor VIII:C was measured by a one-stage method (17). Platelet aggregation studies were performed using the Icare aggregometer with 0.3 ml of platelet-rich plasmas (PRP). Aggregating agents (0.1 ml) included collagen, ADP and Ristocetin which were used respectively in final concentrations of 8 µg/ml, 2.5 µM, 1.2 mg/ml. Factor VIII R:Ag was assayed by an electro-immunodiffusion method (18) or an ELISA assay (19). Factor VIII R:RCF was tested on microtitration plates according to the method of Sultan and Rossi (20). Assay of an inhibitor against VIII:C was performed as described by Kasper et al. (21).

The inhibitory action on VIII R:RCF was investigated by comparing the curves of aggregation induced by Ristocetin (1.2 mg/ml) obtained with 100 µl sample of the patient's plasma (or of plasma fractions) incubated with 200 µl of a normal P.R.P. As a blank, 100 µl of buffer and 200 µl of normal PRP were incubated before the addition of Ristocetin.

3. Fractionation of Immunoglobulins

IgM was separated from other immunoglobulins by gel filtration of 2.5 ml of serum from Fo... on a column (2.5 x 120 cm) containing Ultrogel Aca 34, equilibrated in 0.05 M Tris/HCl buffer pH 8.0 containing 0.5 M NaCl. The IgG was purified from the concentrated fractions obtained after elimination of IgM, by ion-exchange on DEAE-Sephadex according to Webb (22). The different fractions were analysed by immuno-electrophoresis against an anti-whole human serum, after concentration of the protein to about 10% (w/v).

Results

1. Diagnosis of Acquired vWD

Pre-operative laboratory data showed both abnormalities of primary hemostasis and of coagulation compatible with a diagnosis of vWD. However, some weeks later the three activities of F VIII/vWF had returned to normal (Table 1). A decrease of platelet aggregation by collagen and ADP was also noted (respectively 45% and 40% compared to control values of 70% and 72%). Repeated analysis has not demonstrated any change up till now in paraprotein concentration and platelet aggregation induced by collagen and ADP.

Among the family, only the patient's two sons have been investigated: they have normal bleeding times and normal values for VIII:C, VIII R:Ag and VIII R:RCF.

*Correspondence to: Dr. C. Mazurier, Laboratoire d'Hémostase, Centre Régional de Transfusion Sanguine, 21, Rue Camille Guérin, Lille, France

Table 1 Laboratory investigations

Examination	Date	January 1979	March 1979	May 1979	Normal values
Bleeding Time					
Duke		4 min 30	4 min	4 min 30	< 4 min
IVY		> 20 min	-	7 min	< 10 min
Activated partial thromboplastin time (sec)		54 (39)	43 (41)	41 (35)	Difference from control (in parentheses) less than 10 sec
VIII: C (U/ml)		0.27	0.52	0.7	> 0.5
VIII R: Ag (U/ml)					
Laurell		0.10	1	1.30	> 0.5
Elisa		0.15	1.20	1.23	
VIII R: RCF (U/ml)		< 0.3	0.50	0.50	> 0.5
Platelet retention on glass beads (%)		9	31	7	> 50%

2. Demonstration of an Inhibitor

A. Response to factor VIII infusion. One hour after the infusion of cryoprecipitates (28 U VIII: C/kg) the value of VIII: C was 0.62 U/ml (Fig. 1) whilst, taking into account the patient's plasma volume, it should have been 0.92 U/ml. Moreover after 3 h. there was no retarded increase of VIII: C as is typical in vWD. The apparent elevation of the VIII R: RCF level 3 h after infusion is not significant as it falls within the limits of precision of the assay.

B. Tests for inhibition of factor VIII. Assay for an inhibitor against VIII: C was carried out on the patient's plasma previously heated to 56°C for 30 min. It was initially slightly positive (0.5 Bethesda unit) but was subsequently always negative. Tests for inhibition of VIII R: Ag were also negative. Using the OUCHERLONY method (23) no precipitating antibody was found and addition of a plasma sample from the patient to normal plasma did not reduce the VIII R: Ag level apart from the dilution effect. Tests for inhibition of VIII R: RCF proved positive. The patient's

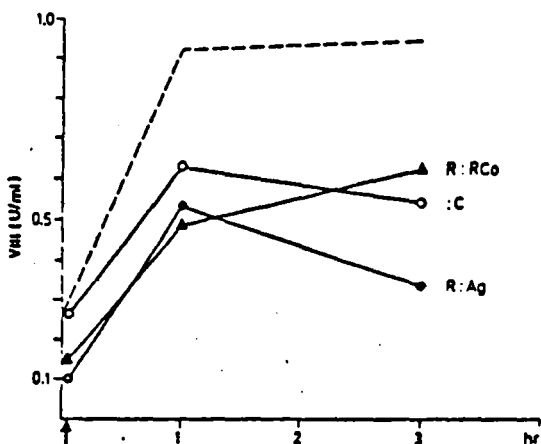


Fig. 1 Level of the different factor VIII-linked activities before and after infusion of 28 U/kg anti-hemophilic factor A (lyophilized cryoprecipitates) in patient Fo... (the recovery of VIII: C expected in a case of constitutional von Willebrand's disease is shown by the dashed line).

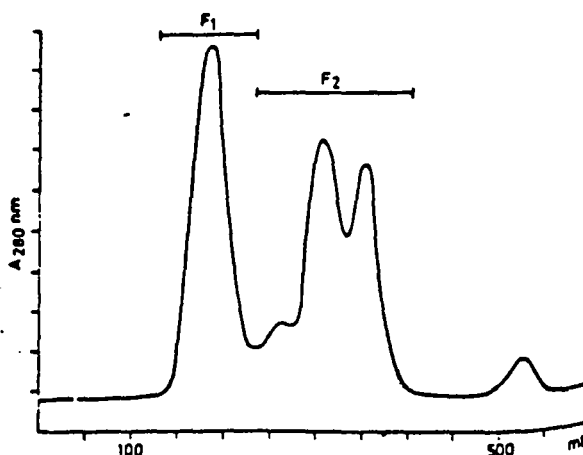


Fig. 3 Elution diagram obtained by gel filtration of 2.5 ml of serum from Fo... on a column (2.5 x 120 cm) containing Aca 34 equilibrated with Tris (0.05 M) - HCl buffer pH 8.0 containing 0.5 M NaCl. Flow rate was 30 ml/h.

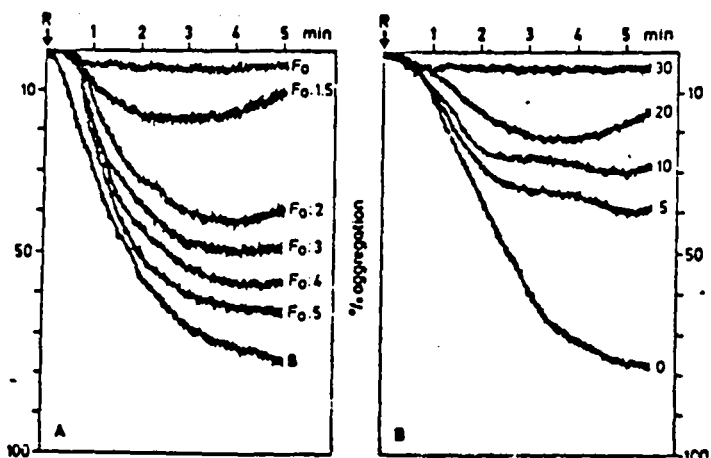


Fig. 2 Demonstration in the plasma of Fo... of an inhibitor of the Ristocetin aggregation (R: 1.2 mg/ml) of a normal platelet - rich plasma (PRP). A: curves obtained with 200 µl PRP incubated 30 min with 100 µl of buffer (B) or pure or diluted (1/1.5 to 1/5) plasma from Fo... B: curves obtained with 200 µl PRP incubated for times varying between 0 and 30 min with 100 µl of plasma from Fo...

plasma incubated at 37°C with normal PRP inhibited the Ristocetin platelet aggregation of this PRP. This inhibition is dependent on the amount of the patient's plasma added (Fig. 2 A) and on the incubation time (Fig. 2 B).

3. Purification of the Inhibitor

By gel filtration of the patient's serum (see methods) we obtained IGM in peak F 1 (Fig. 3). This fraction was separated from peaks 2 and 3 which were pooled to form fraction F2. The inhibitor effect on Ristocetin aggregation was assayed in fractions F1 and F2. Fig. 4 gives the aggregation curves obtained without pre-incubation (A) and after 30 min. at 37°C (B). In the absence of pre-incubation no Ristocetin aggregation inhibition was observed in either F1 or F2. However, after pre-incubation F2 exhibited a significant effect whilst F1 was devoid of activity. Thus fraction F2 contained the specific "time-dependent" inhibitor of Ristocetin aggregation, this fraction being devoid of IgM and containing, among other proteins, IgG.

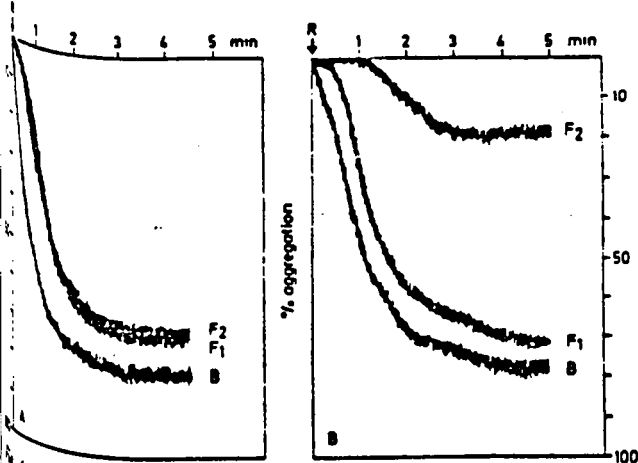


Fig. 4 Investigation of inhibitor activity after gel filtration: to 200 μ l of normal PRP were added 100 μ l of buffer (B) or of fraction F1 (13.7 g/l) or of fraction F2 (7.5 g/l). 100 μ l of Ristocetin (R = 1.2 mg/ml) was added immediately (A) or after 30 min incubation at 37° C (B).

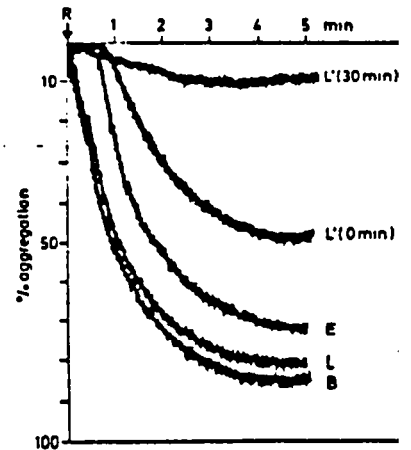


Fig. 5 Investigation of inhibitor activity after purification by ion exchange. Aggregation curves obtained on adding 100 μ l of Ristocetin (R: 1.2 mg/ml) to 200 μ l of normal PRP added of 100 μ l of buffer (B) or of the different fractions obtained after separation on DEAE-Sephadex (L, L' and E). If the mixtures were preincubated 30 min at 37° C before the addition of Ristocetin the traces were superimposable except in the case of L' for which two curves obtained are shown.

Purification of the IgG of fraction F2 was realized by batch adsorption on DEAE-Sephadex. The fraction eluted in the buffer was termed L and subsequent washing with 0.02 M sodium phosphate buffer pH 6.5 gave the fraction L'. The remaining fixed proteins were eluted by 1 M NaCl and were the fraction E. Fractions L and L' only contained IgG, fraction E containing the other serum proteins remaining after the gel filtration step. Fig. 5 compares the action of fractions L, L' and E (concentrated to the initial serum volume) on the Ristocetin aggregation of normal PRP. Fraction L had no anti-aggregating effect, even after a 30 min pre-incubation. Fraction E seemed to cause a slight inhibition in the aggregation, but the effect did not increase during the incubation. In fraction L', shown by immunoelectrophoresis to contain only IgG, all the "time-dependent" inhibitor effect previously demonstrated in the plasma was found. The various investigations did not establish whether or not the IgG was monoclonal.

Discussion

The true incidence of acquired vWD syndrome seems very low since it has only been described in about 20 patients. The syndrome is often associated with auto-immune diseases such as chronic lymphopathies: systemic lupus erythematosus: 4 cases (1, 3, 4, 13), Felty's syndrome: 1 case (7), malignant lymphoma: 1 case (13), and "benign" monoclonal gammopathy: 4 cases (5, 6, 11, 14). The other cases seem to be associated with probably intercurrent events, for instance after splenectomy (2), in a patient with Ehlers-Danlos syndrome (1) or in a diabetic (10) or to be idiopathic (3). The association with primary macroglobulinemia has not been reported in the medical literature. Most of the laboratory features are similar to those observed in constitutional vWD and are directly correlated with the deficiency of normal factor VIII/von Willebrand (VIII/vWF): prolonged bleeding time, platelet retention on glass and aggregation in the presence of Ristocetin perturbed, and simultaneous low levels of factor VIII:C and VIII R:Ag. The pathogenesis of these abnor-

malities has been much discussed. The recovery factor VIII which is poor in most of the patients (12/14 cases) and the absence of secondary rise in VIII:C characterizing constitutional vWD (24) suggest the presence of an inhibitor interacting with factor VIII/vWF. Generally no inhibitory activity against factor VIII activity could be demonstrated but in some of the cases reported (11, 12) it seems that the incubation time (2 min, 37° C) during the test for inhibition of VIII R:RCF was too short to detect a weak inhibitor. In the absence of circulating inhibitor the low level of factor VIII could be due, according to some authors (12, 14, 25) to an accelerated catabolism of this factor. This accelerated clearance may have resulted from adsorption of large forms of VIII/vWF onto lymphocytes of the patients described by Jørgensen (12) and Meyer (25) as this mechanism has been demonstrated recently in a case of Waldenström's macroglobulinemia with VIII:C and VIII R:AG deficiencies. Immune complex formation between monoclonal IgG K and factor VIII in the case reported by Zettervall and Nilsson (14) can also explain the fact "in vivo" disappearance of all factor VIII-related activities. An inhibitor which specifically prevents aggregation of normal platelets by ristocetin was clearly demonstrated in the plasma of patients and in the platelet eluates of a fourth (10). In two cases is IgG in nature (8, 13) and in the third IgA (9).

In the case of our patient (with Waldenström's disease), the question was whether the antibody activity anti-VIII R:RCF carried by the monoclonal IgM present at high concentration since it is known that monoclonal IgM can possess antiblood activity (27). Whilst it is not surprising that this paraprotein disturbs platelet aggregation by ADP and collagen since it is present at a high concentration in the plasma (28), it does not intervene, in contrast, in the "time-dependent" inhibitor effect. This specific inhibitory action was found in a fraction purified by gel filtration and ion-exchange chromatography in which only IgG was present. It is thus possible to consider that the appearance of vWD syndrome in our patient could be due to an autoimmunisation process electively directed against the VIII R:RCF. The existence of such an antibody of type IgG in the course of the malignant lymphopathy (which Waldenström's disease is), can be classified with the abnormalities in immune function observed in such diseases, shown by the frequency of occurrence of anterythrocyte, anti-platelet and other auto-antibodies.

References

- 1 Simone J V, Cornet J A, Abildgaard C F. Acquired von Willebrand's syndrome in systemic lupus erythematosus. *Blood* 1968; 31: 806-812.
- 2 Veltkamp J J, Stevens P, Plas MVD, Loeliger E A. Production site of bleeding factor (acquired morbus von Willebrand). *Thromb Diath Haemorrh* 1970; 23: 412.
- 3 Ingram G I, Kingston P S, Leslie J, Bowie E J. Four cases of acquired von Willebrand's syndrome. *Br J Haematol* 1971; 21: 189-199.
- 4 Poole-Wilson P A. Acquired von Willebrand's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Proc Soc Med* 1972; 65: 7-8.
- 5 Meyer D, Jenkins C S, Dreyfus M D, Fressinaud E, Larrieu M J. Willebrand factor and Ristocetin. *Br J Haematol* 1974; 28: 579-599.
- 6 Mant M J, Hirsh J, Gaudie J, Bienenstock J, Pineo G F, Luke K H. Von Willebrand's syndrome presenting as an acquired bleeding disorder in association with a monoclonal gammopathy. *Blood* 1973; 42: 429-436.
- 7 Leone G, Pola P, Guerrero G, Bizzi B. Acquired von Willebrand's syndrome during collagen disorder. *Haematologica* 1974; 59: 212-220.
- 8 Handin R I, Martin V, Moloney W C. Antibody-induced von Willebrand's disease: a newly defined inhibitor syndrome. *Blood* 1976; 48: 393-406.
- 9 Wautier J L, Levy-Toledano S, Caen J. Acquired von Willebrand's syndrome and thrombopathy in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *Scand J Haemat* 1976; 16: 128-134.
- 10 Stableforth P, Tamagnini G L, Dormandy K M. Acquired von Willebrand's syndrome with inhibitors both to factor VIII clotting activity and Ristocetin induced platelet aggregation. *Br J Haematol* 1976; 33: 565-573.
- 11 Rosborough T K, Swaim W R. Acquired von Willbrand's disease, platelet release defect and angiodysplasia. *Am J Med* 1978; 65: 96-100.
- 12 Joist J H, Cowan J F, Zimmerman T S. Acquired von Willebrand's disease. *New Engl J Med* 1978; suppl 7: 988-991.
- 13 Gazengel C, Prieur A M, Jacques C, Buriot D, Nedellec J, Josso F. Antibody-induced von Willebrand's syndrome inhibition of VIII: VWF and VIII: AGN with sparing of VIII: AHF by the auto-antibody. *Am J Hematol* 1978; 5: 355-363.
- 14 Zettervall I, Nilsson I G. Acquired von Willebrand's disease caused by a monoclonal antibody. *Acta Med Scand* 1978; 204: 521-528.
- 15 Clough V, Mac Farlane I A, O'Connor J, Wood J K. Acquired Willebrand's syndrome and Ehlers-Danlos syndrome presenting with gastro-intestinal bleeding. *Scand J Haematol* 1979; 22: 305-310.
- 16 Caen J, Larrieu M J, Samama M. In: L'hémostase. Expansion scientifique, 2^e ed 1975.
- 17 Soulier J P, Larrieu M J. Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des fractions antihémophiliques A et B. *Sang* 1953; 205-215.
- 18 Laurell C B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem* 1966; 15: 45-52.
- 19 Mazurier C, Parquet-Gernez A, Goudemand M. Dosage de l'antigène lié au facteur VIII par la technique ELISA. *Path Biol* 1977; Suppl 25: 18-24.
- 20 Sultan Y, Rossi J. Méthode de mesure de l'activité Willebrand sur plaque de microtitration. *Nou Presse Méd* 1977; 6: 44-46.
- 21 Kasper C K et al. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh (Stutt.)* 1975; 34: 869-872.
- 22 Webb A J. A 30 minute preparative method for isolation of IgG from human serum. *Vox Sang* 1972; 23: 279-290.
- 23 Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr Allergy* 1958; 5: 1-78.
- 24 Hoyer L M. Von Willebrand's disease. *Sem Thromb Hemostas.* 1976; 2: 231-287.
- 25 Meyer D, Frommel D, Larrieu M J, Zimmerman T S. Selective absence of large forms of factor VIII/Von Willebrand factor in acquired von Willebrand's syndrome. Response to transfusion. *Blood* 1979; 54: 600-606.
- 26 Brody J I, Haidar M E, Rossman R E. A hemorrhagic syndrome in Waldenström's macroglobulinemia secondary to immunoadsorption of factor VIII. *New Engl J Med* 1970; 300: 408-410.
- 27 Seligmann H, Brouet J C. Antibody activity of human myeloma globulins. *Seminars in Hematology* 1973; 10: 163-177.
- 28 Parquet-Gernez A, Kacem M. Thrombopathies des dysglobulinémies. *Nou Rev Fr Hématol* 1976; 16: 437-442.

Received April 2, 1980 Resubmitted July 14, 1980
Accepted September 19, 1980

Durant ces quinze dernières années, plusieurs dizaines d'observations concernant des cas de maladie de Willebrand acquise ont été rapportées. Afin de faire le point sur ce sujet, nous avons regroupé dans le tableau XVIII (p.150-152) la plupart des cas publiés, en essayant de mettre en évidence les résultats biologiques, les circonstances d'apparition et les causes possibles des anomalies du FVIII/vWf. Il apparaît que plusieurs mécanismes ont été évoqués afin d'expliquer la diminution de ce complexe : la présence d'un inhibiteur circulant, l'absorption du FVIII/vWf sur les lymphocytes ou au niveau de tumeurs, un catabolisme augmenté du FVIII/vWf. Ces mécanismes ne sont peut être pas les seuls en cause et, de plus, ils peuvent agir certainement de façon conjointe: ainsi la formation d'immun-complexes entre le F VIII/vWf et un inhibiteur peut entraîner une augmentation de l'élimination du F VIII/vWf. En fait, la forme acquise de la maladie de vWD se révèle hétérogène et complexe, du moins dans son étiologie, et ceci explique certainement que les études effectuées jusqu'à présent n'aient pas apporté d'éléments prépondérants dans le domaine de la connaissance de la physiopathologie du F VIII/vWf.

TABLEAU XVIII

PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS CAS DE MALADIE DE

WILLEBRAND ACQUISE RAPPORTES DANS LA LITTÉRATURE

PUBLICATION	F VIII/vWf (en U/ml)			Circonstance d'apparition	Recherche d'un inhibiteur	Etiologie invoquée
	VIII : C	VIII R : Ag	VIII R : RCo			
SIMONE et al. 1968 (678)	0,04 à 0,17	-	-	Lupus	antiVIII:C=neg	Phénomène auto-immun
VELTKAMP et al. 1970 (679)	0,03			Ingestion de pesticide	antiVIII:C=neg	Hypersensibilité
LEHRMAN et al. 1971 (680)	0,2 à 0,35	0,40		Composant mono clonal discret	antiVIII:C=neg	Phénomène auto-immun
et POOLE-WILSON 1972 (681)	0,02 à 0,22	-		Lupus		
	0,07 à 20	0,05		Aucune		
et al. 1973 (682)	0,04 à 0,18	0,05		Aucune		Mécanisme humoral ou cellulaire
	0,05 à 0,20	0,04		Gammapathie bénigne à IgG ₃ Lambda	antiVIII:C=neg antiVIII:Ag = neg	



TABLEAU XVIII (SUITE)

PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS CAS DE MALADIE DE

WILLEBRAND ACQUISE RAPPORTES DANS LA LITTÉRATURE

MEYER <i>et al.</i> 1974 (683)	0,10	< 0,05	< 0,05	Gammopathie bénigne à IgG Kappa		
LEONE <i>et al.</i> 1974 (684)	0,15	0,20	Anomalie de l'agrégation à la ristocétine	Syndrome de Felty	antiVIII:C=neg	
HANDIN <i>et al.</i> 1976 (685)	0,14 à 0,25	0,10 à 0,20	0,13 à 0,15	lymphosarcome	antiVIII:C=neg antiVIIIIR:Ag = neg antiVIIIIR:RCO = pos	Présence d'un inhibiteur de type IgG pouvant affecter la synthèse ou l'élimination du F VIII/vwf
WAUTIER <i>et al.</i> 1976 (686)	0,52	0,10 à 0,20	0,06 à 0,1	Leucémie lymphoïde chronique	antiVIIIIR:RCO = pos	- Inhibiteur (IgA) spécifique ou non, - Association d'une anomalie plaquettaire.
STABLEFORTH <i>et al.</i> 1976 (687)	0,015	< 0,10	Agrégation à la ristocétine = nulle	Diabète sucré	antiVIII:C=pos antiVIIIIR:RCO= présent dans l'éluat des plaquettes.	Présence d'un inhibiteur différent de l'anti VIII:C
ROSBOROUGH <i>et al.</i> 1978 (688)	0,09	< 0,03	< 0,03	Gammopathie bénigne à IgG Kappa	antiVIII:C=neg antiVIIIIR:RCO = neg	Anomalies associées de type plaquettaire et vasculaire
JOIST <i>et al.</i> 1978 (689)	0,45	0,19	0,12	Lymphome pulmonaire	antiVIII:C=neg antiVIIIIR:Ag = neg antiVIIIIR:RCO = neg	Fixation des formes très polymérisées du F VIII/ vWF sur les lymphocytes. Augmentation du catabolisme des formes très polymérisées du F VIII/vWF, sous l'influence d'une substance sécrétée par les lymphocytes malins.
GAZENGEL <i>et al.</i> 1978 (690)	0,08	< 0,05	< 0,025	Lupus	antiVIII:C=neg antiVIIIIR : Ag = pos antiVIIIIR:RCO = pos	Présence d'un inhibiteur de type IgG
ZETTERVALL <i>et NILSSON</i> 1978 (689')	0,36	0,25	0,26	Lymphome malin avec composant monoclonal = IgG Kappa	antiVIII:C=neg antiVIIIIR : Ag = neg antiVIIIIR:RCO = neg	Les IgG monoclonales se fixent au F VIII/vwf et augmentent son élimination.
CLOUGH <i>et al.</i> 1979 (690')	0,01	0,05	0,05	Syndrome de Ehlers-Danlos	antiVIII:C=neg antiVIIIIR : Ag = neg antiVIIIIR:RCO = neg	

TABLEAU XVIII (SUITE)

PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS CAS DE MALADIE DE

WILLEBRAND ACQUISE RAPPORTES DANS LA LITTÉRATURE

SCHNEIDER <i>et al.</i> 1979 (691)	≈ 0.20	≈ 0.20	Agrégation à la ristocétine nulle.	Lymphome malin	antiVIII:C=pos antiVIIIIR:Ag = pos	Présence d'un inhibiteur et possibilité d'adsorption du F VIII/vwf sur les lymphocytes malins.
PIZZUTO <i>et al.</i> 1979 (692)	0,06	-	0,47	Lupus et Syndrome de Sjögren	antiVIII:C=pos	Phénomène auto-immun.
MEYER <i>et al.</i> 1979 (693)	0,09	0,06	< 0,03	Gammopathie bénigne à IgG Kappa	antiVIII:C=neg antiVIIIIR:Ag = neg antiVIIIIR:RCo = neg	Diminution de la synthèse des formes très polymérisées du F VIII/vwf. Elimination accrue ou adsorption de ces formes sur les cellules lymphoïdes.
Mc GRATH <i>et al.</i> 1979 (694)	0,06	< 0,04	< 0,04	Telangiectasie gastro-intestinale.	antiVIII:C = faible antiVIIIIR:Ag = pos antiVIIIIR:RCo = faible	Inhibiteur de type IgG ne précipitant pas le VIII R: Ag mais pouvant induire une augmentation de l'élimination du F VIII/vwf.
DOUVAULT HEILMANN <i>et al.</i> 1979 (695)	0,17	0,09	< 0,1	Gammopathie bénigne à IgG Lambda	antiVIII:C=neg antiVIIIIR:Ag = neg antiVIIIIR:RCo= présent dans la fraction IgM	Phénomène auto-immun et augmentation de l'élimination du F VIII/vwf.
BRODY <i>et al.</i> 1979 (696)	0,05	0,10	-	Macroglobulinémie de Waldenström	antiVIII:C=neg antiVIIIIR:Ag = neg antiVIIIIR:RCo = neg	Adsorption du F VIII/vwf sur les lymphocytes du sang et de la rate.
ROUSSI <i>et al.</i> 1980 (697)	0,27	0,50	0,32	Leucémie à Tricholeucocytes	antiVIII:C=neg antiVIIIIR:Ag = neg antiVIIIIR:RCo = neg	Adsorption de formes très polymérisées du F VIII/vwf sur les tricholeucocytes.
MAZURIER <i>et al.</i> 1980	0,27	0,10	< 0,3	Magrobulinémie de Waldenström	antiVIII:C=neg antiVIIIIR:Ag = neg antiVIIIIR:RCo = pos	Inhibiteur de type IgG. Phénomène auto-immun.
GAN <i>et al.</i> 1980 (698)	0,08	< 0,1	< 0,1	Syndromelympho prolifératif probable. Gammopathie à IgG Kappa avec protéinurie	antiVIII:C=neg antiVIIIIR:Ag = neg antiVIIIIR:RCo =	Les IgG monoclonales se fixent au F VIII/vwf et induisent une élimination augmentée par le système réticulo-endothélial.
DURAN-SAUREZ <i>et al.</i> 1981 (699)	0,20	0,18	0,12	Leucémie myéloïde chronique	antiVIII:C=neg antiVIIIIR:Ag = neg antiVIIIIR:RCo = neg	Les leucocytes induisent une augmentation de l'élimination du F VIII/vwf
SCOTT <i>et al.</i> 1981 (700)	0,18	< 0,06	< 0,28	Tumeur de Wilson	antiVIII:C=neg antiVIIIIR:Ag = neg antiVIIIIR:RCo = neg	Excrétion diminuée du F VIII/vwf des cellules endothéliales. Catabolisme augmenté. Pas de phénomène immunologique ni d'adsorption du F VIII/vwf au niveau de la tumeur.

BU
LILLE

ETUDE BIOCHIMIQUE DU F VIII/vWf

Dans cette dernière partie, nous avons rassemblé d'abord des articles consacrés à la purification du F VIII/vWf. Le but de ce travail était double. Il avait un aspect appliqué car on nous avait confié la mise au point d'une technique de préparation de fraction antihémophile A concentrée à usage thérapeutique. Il comportait également un aspect fondamental puisqu'en visant à obtenir une préparation pure de F VIII/vWf, il constituait l'étape préalable nécessaire à toute étude biochimique précise sur le complexe F VIII/vWf. Bien que nous ayons dû tenir compte d'impératifs différents (p.17) pour atteindre ces deux objectifs, les expérimentations nous ont bien souvent été profitables dans les deux domaines et c'est ainsi que, par exemple, nous utilisons, au laboratoire, comme première étape de purification du F VIII/vWf, la technique mise au point pour la préparation de concentré thérapeutique.

Nous avons fait figurer ensuite certains résultats acquis lors de l'étude de la préparation pure de F VIII/vWf. A ce stade, les publications présentées sont essentiellement le reflet de la collaboration entre notre laboratoire du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille (Professeur M. GOUEMAND) et le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Professeur J. MONTREUIL).

I - CONTRIBUTION A L'ISOLEMENT ET A L'ETUDE DE LA MASSE MOLE- CULAIRE DU FACTEUR VIII HUMAIN

Cet article rend compte des possibilités d'enrichissement du complexe F VIII/vwf, à partir de plasma humain, en suivant la technique que OWEN et WAGNER (701) ont mise au point à partir de plasma de chien. Le précipité obtenu après précipitation à froid de plasma concentré environ 2 fois est ensuite purifié par tamisage moléculaire; c'est la fraction obtenue au V_0 qui est enrichie en F VIII/vwf. Nous avons voulu, tout d'abord, vérifier, par des contrôles immunologiques sensibles, sa pureté car à l'époque, la plupart des études biochimiques sur le facteur VIII/vwf ne faisaient état que de critères de pureté à nos yeux insuffisants : par exemple, l'absence d'arc en immunoélectrophorèse simple. Puis nous l'avons soumise à une ultracentrifugation analytique, afin de contribuer à éclaircir le problème de la masse moléculaire du F VIII/vwf qui était l'objet de nombreuses controverses (p.20 à 25). Enfin, nous avons étudié son comportement en milieu de force ionique élevée afin de vérifier la possibilité de dissociation entre le HMW, dépourvu d'activité coagulante mais support du VIII R:Ag et de l'activité VIII R:RCo, et le LMW support de l'activité VIII:C (p.28).

CONTRIBUTION A L'ISOLEMENT ET A L'ÉTUDE DE LA MASSE MOLÉCULAIRE DU FACTEUR VIII HUMAIN

C. MAZURIER¹, A. PARQUET-GERNEZ¹, M. GOUEMAND¹
et J. MONTREUIL²

1. Centre Régional de Transfusion Sanguine, 21, rue Camille-Guérin,
59000 Lille (France)

2. Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217
(Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués),
Université des Sciences et Techniques de Lille I, B. P. 36,
59650 Villeneuve-d'Ascq (France)

RÉSUMÉ. — La préparation à partir de plasma, les propriétés biologiques et les critères de pureté de fractions riches en facteur VIII humain sont décrites. L'homogénéité de cette fraction qui contient l'activité coagulante VIII, l'« antigène VIII » et le « cofacteur Willebrand », a permis d'entreprendre l'étude en ultra-centrifugation analytique $S_{20}^{1,5 \text{ mg/ml}} = 20,5$. Par ailleurs, une fraction possédant une activité coagulante VIII supérieure à celle du plasma de départ et ne contenant ni « antigène VIII », ni « cofacteur Willebrand » a pu être mise en évidence après tamisage moléculaire en tampon de force ionique élevée. Sa masse moléculaire, estimée par chromatographie de filtration sur gel de Sépharose, est voisine de 250 000 daltons.

Mots-clés Medline : Facteur VIII * isolement et purification. — Facteur VIII * analyse. — Poids moléculaire. — Humain.

MAZURIER C., PARQUET-GERNEZ A., GOUEMAND M., MONTREUIL J., 1975. — Contribution à l'isolement et à l'étude de la masse moléculaire du Facteur VIII humain. *Path. Biol.*, 23, suppl., 11-16.

INTRODUCTION

Dès 1937, date à laquelle l'hémophilie a été attribuée par Patek et Taylor (18) à une anomalie d'un facteur plasmatique, de nombreuses équipes de chercheurs se sont attachées à préparer des fractions concentrées de ce facteur en vue d'applications thérapeutiques. Ces fractions servent, bien souvent, de matériel de départ pour des tentatives de purifications ultérieures du facteur VIII [Hersgold et coll. (4), Marchesi et coll. (12), Green (2)]. Jusqu'à présent, il reste difficile d'estimer la pureté des différentes préparations de facteur VIII qui ont été décrites, car les seuls critères appliqués par la plupart des auteurs sont la mise en évidence d'une activité coagulante facteur VIII, l'absence d'autres facteurs de coagulation et la présence d'un seul arc de précipi-

itation en immunoelectrophorèse unidimensionnelle. L'analyse des publications concernant le facteur VIII humain révélant une grande dispersion dans les résultats qui ne permettait pas de bien définir les propriétés physico-chimiques de ce composé, nous avons entrepris d'étudier les différents procédés décrits dans la littérature en vue de retenir celui qui fournirait rapidement les composés les plus actifs et les plus homogènes en ultracentrifugation analytique et en immunoelectrophorèse uni- et bidimensionnelle. Notre choix s'est fixé sur la méthode d'Owen et Wagner (16) proposée pour purifier le facteur VIII canin. Nous rapportons, dans le présent mémoire, les résultats préliminaires que nous avons obtenus, concernant en particulier la masse moléculaire « du complexe facteur VIII » (activité coagulante et activité antigénique) et de la sous-unité « LMW » responsable de l'activité coagulante.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Préparation du facteur VIII.

L'isolement d'un précipité riche en facteur VIII (précipité P-VIII) a été réalisé selon le procédé d'Owen et Wagner (16) : concentration du plasma par dialyse contre du polyéthylène glycol 20 000 (PEG - 20 000) tamponné à pH 7,25 et refroidissement du plasma concentré, à 0°C pendant 30 mn.

Chromatographie de tamisage moléculaire. Le précipité P-VIII est dissous dans un volume de tampon représentant 1/40 du volume du plasma de départ. Il est purifié par chromatographie de tamisage moléculaire effectué à + 4°C sur une colonne (2,5 X 70 cm) de Sépharose 6 B à l'aide de tampon imidazole 0,02 M - NaCl 0,14 M de pH 6,5 (débit : 20 ml/h ; volume des fractions recueillies : 3 ml).

La détermination de l'activité coagulante VIII a été effectuée par la méthode en un temps de Soulier (25).

Le dosage du « cofacteur Willebrand » a été réalisé à l'aide d'une technique dérivée de la méthode de Weiss et al. (26). Le mode opératoire est le suivant :

Préparation des plaquettes lavées : 9 volumes de sang témoin sont recueillis sur 1 volume de solution anticoagulante d'après le schéma (citrate de sodium : 4,48 p. 100, acide citrique : 2,75 p. 100, glucose : 2 p. 100). Le plasma riche en plaquettes (PRP) est obtenu par une centrifugation de 2 mn à 1 800 rpm. 4 ml de PRP sont déposés sur 0,5 ml d'une solution d'albumine bovine (1 p. 100 dans un tampon Tris - HCl 0,05 M de pH 7,4 et centrifugés 10 mn à 3 500 rpm. Les plaquettes ainsi concentrées sont soumises à 3 lavages en tampon Tyrode sans CaCl₂ avec centrifugation sur 0,5 ml d'albumine.

Agrégation par la ristocétine. Après avoir vérifié que les plaquettes lavées ne s'agrègent pas spontanément en présence de ristocétine (nombre de lavages insuffisants ou vieillissement des plaquettes), on effectue les agrégations dans les conditions suivantes : à 100 µl de différentes dilutions de plasma témoin on ajoute 100 µl de solution à analyser, sont ajoutés 300 µl de la suspension de plaquettes lavées (200 000/mm³), puis 100 µl d'une solution de ristocétine (concentration finale 1,2 mg/ml).

Calcul du taux de « cofacteur Willebrand ». On trace une courbe d'étalonnage en reportant la « vitesse d'agrégation » en fonction de la dilution du plasma témoin correcteur. Le taux de cofacteur se détermine en faisant la moyenne des valeurs obtenues pour trois dilutions de la préparation à doser en se rapportant à la droite obtenue avec le plasma témoin.

4) Techniques immunologiques.

Les antisérums utilisés ont été préparés au laboratoire : sérum de Lapin anti-sérum humain total, sérum de Lapin anti-facteur VIII humain selon la technique de Zimmermann et Ratzenberg (23). Les immunoelectrophorèses unidimensionnelles ont été effectuées selon la technique de Scheidegger (21) et les immunoelectrophorèses bidimensionnelles suivant le procédé de Mancini (7) sur des fractions préalablement soumises à une dialyse sur des membranes (UH 100 - Schleicher & Schuell) de manière à obtenir une concentration de 10 mg de protéines par ml.

L'immuno-immunodiffusion quantitative a été réalisée selon Mancini (8) et l'immunodiffusion radiale simple selon Mancini (9).

5) Dosage de protéines.

Les protéines ont été dosées par les techniques de Lowry (10) et de Schaffner (20).

6) Ultracentrifugation analytique.

L'étude de la constante de sédimentation a été effectuée à la seule concentration de facteur VIII (1,5 mg/ml de tampon imidazole 0,02 M - NaCl 0,14 M de pH 6,5) dans une ultracentrifugeuse Spinco, modèle E, à la vitesse de régime de 30 000 rpm à 20°C. La constante de sédimentation a été déterminée selon Svedberg (26).

RÉSULTATS

1) Obtention du précipité riche en facteur VIII.

A partir de 200 g de plasma, nous obtenons un précipité (P-VIII) qui, redissous dans 5 ml de tampon imidazole, contient 30 mg par ml de protéines et 30 unités par ml d'activité coagulante VIII et d'antigène lié au facteur VIII.

2) Propriétés biologiques de la fraction enrichie en facteur VIII.

La figure 1 représente le diagramme d'éluion obtenu après purification du précipité riche en facteur VIII (P-VIII) sur colonne de Sépharose 6 B en tampon de force ionique physiologique. Au volume mort de la colonne (Vo) est recueillie une fraction qui absorbe peu la lumière ultraviolette et dans laquelle on retrouve pratiquement toute l'activité coagulante facteur VIII du précipité P-VIII. Le rendement total de cette méthode de préparation en activité coagulante atteint 50 % après la filtration sur agarose. La fraction Vo donne un arc de précipitation unique avec le sérum de Lapin anti-VIII et corrige la rétention sur billes de verre (13, 14) et l'agrégation par la ristocétine de plaquettes de sujets atteints de maladie de Willebrand.

Sur chacune des solutions collectées au Vo, nous avons déterminé (fig. 2), la densité optique à 280 nm, la concentration en protéines, l'activité coagulante facteur VIII et le taux d' « antigène lié au facteur VIII ».

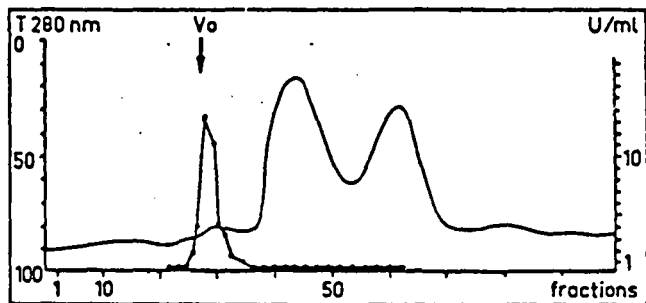


Fig. 1. — Chromatographie sur Sépharose 6 B du précipité P-VIII (150 mg de protéines), riche en facteur VIII (150 unités coagulantes VIII). Colonne de 2,5 X 70 cm ; tampon imidazole 0,02 M - NaCl 0,14 M de pH 6,5 ; température : + 4°C ; débit : 20 ml/h ; volume des fractions recueillies : 3 ml.
— (—) p. 100 de transmission (T) à 280 nm.
— (●—●) activité coagulante VIII en unités/ml (U/ml).

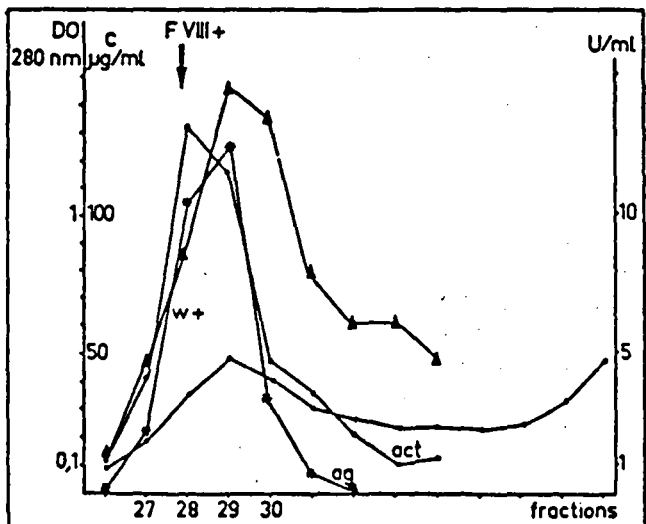


Fig. 2. — Propriétés de la fraction éluee au Vo de la colonne de Sépharose 6 B.
— (●—●) : densité optique (DO) à 280 nm.
— (▲—▲) : concentration en protéines (c) en µg/ml.
— (○—○) : activité coagulante facteur VIII (Act) en unités/ml.
— (■—■) : taux d' « antigène lié au facteur VIII » (Ag).
— (+) : taux de « cofacteur Willebrand » (une seule détermination).

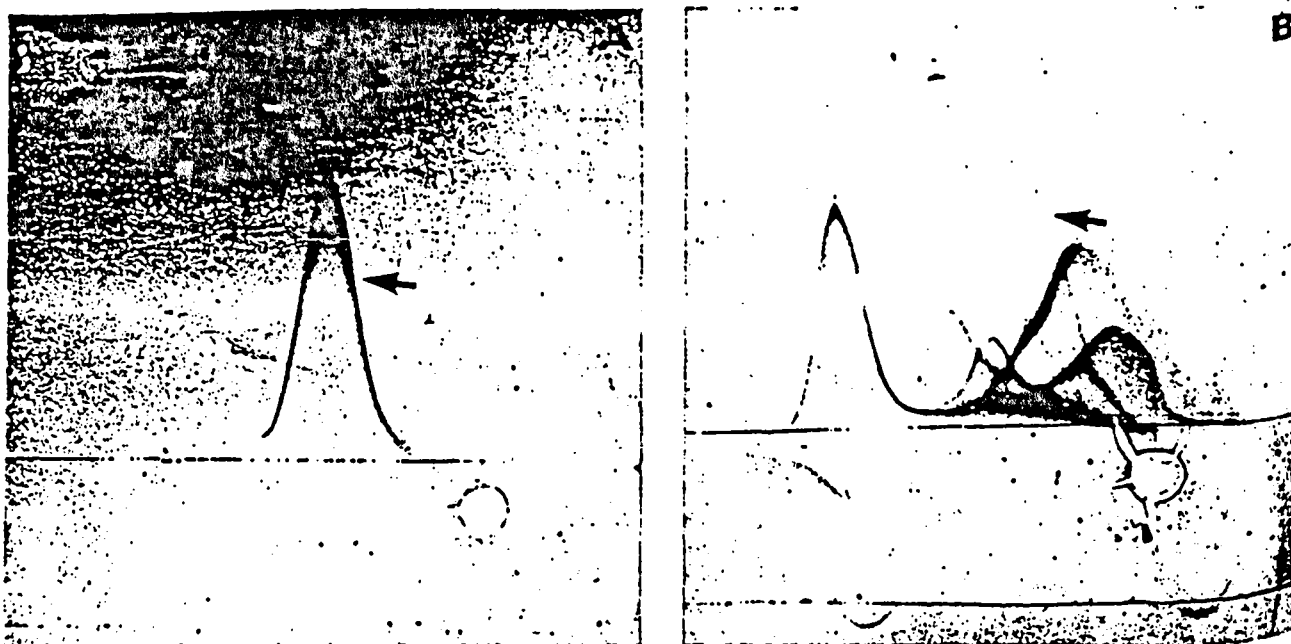


Fig. 3. — Analyse en électrophorèse bidimensionnelle, contre un antisérum humain total de deux préparations (A et B) de facteur VIII à la concentration de 10 mg/ml (le pic de précipitation du facteur VIII est indiqué par une flèche).

La fraction contenant l'activité coagulante spécifique la plus élevée est appelée F-VIII⁺. La moyenne des activités spécifiques des fractions F-VIII⁺ de 10 préparations différentes est de 150 unités coagulantes par mg de protéine, ce qui correspond à un enrichissement de 10 000 fois.

3) Contrôle immunologique de pureté.

Les résultats fournis diffèrent profondément, d'une part, avec le procédé d'immuno-électrophorèse utilisé et, d'autre part, avec les préparations analysées. En effet, l'immuno-électrophorèse *unidimensionnelle* des fractions F-VIII⁺ à 10 mg de protéines par ml donne, avec un antisérum humain total, un seul arc de précipitation qui se situe dans la région des α_2 -globulines. Néanmoins, ce résultat n'est pas obtenu avec tous les antisérums humains. Au contraire, l'immuno-électrophorèse *bidimensionnelle*, selon Laurell, montre que les contaminants qui accompagnent le facteur VIII varient en qualité et en quantité d'une préparation à l'autre : les unes, en effet, en sont totalement exemptes (fig. 3 A), d'autres ne renferment que de la sérum-albumine et du fibrinogène, d'autres encore sont très hétérogènes et contiennent jusqu'à une dizaine de constituants (fig. 3 B). Les mêmes résultats sont obtenus par la méthode de Mancini qui précise toutefois que les quantités de substances contaminantes sont toujours inférieures à 10 % pour le fibrinogène, à 5 % pour la sérum-albumine et pour les IgG et à 2 % pour les IgA, les IgM et le plasminogène. Ces résultats montrent donc que la composition des préparations de facteur VIII est variable et doit être systématiquement soumise à l'analyse immunoélectrophorétique *bidimen-*

sionnelle. Certaines, en effet, sont pures mais d'autres le sont à environ 90 %, le taux maximal de contamination restant toutefois inférieur à 20 %. Il est donc possible à présent d'isoler le facteur VIII, mais il reste à perfectionner le procédé de manière à obtenir systématiquement des préparations pures. L'entreprise est difficile car l'écart entre la masse moléculaire du facteur VIII et celle des contaminants n'explique pas la présence de ceux-ci dans le « pic d'exclusion » des colonnes de Sépharose 6 B et il faut donc admettre qu'ils sont adsorbés sur les macromolécules qui constituent le facteur VIII. L'ultracentrifugation analytique confirme cette hypothèse.

4) Ultracentrifugation analytique.

L'ultracentrifugation d'une préparation de facteur VIII homogène en immuno-électrophorèse bidimensionnelle (fig. 3 A) et renfermant 30 unités coagulantes facteur VIII par ml a été réalisée, pour l'instant, à une seule concentration. Elle montre la présence d'un pic unique bien symétrique, inclus dans une ligne de base qui ne révèle aucun autre pic qui serait le témoin de l'existence de composés présents dans les échantillons dans une proportion supérieure à 3-5 %. La constante de sédimentation est, pour une concentration de 1,5 mg/ml de tampon imidazole 0,02 M-NaCl 0,14 M de pH 6,5 ($S_{20}^{1,5 \text{ mg/ml}}$), $d_s \approx 20,5$.

5) Influence de l'augmentation de la force ionique.

Le diagramme d'éluion obtenu lorsque le précipité P-VIII isolé à partir de 200 g de plasma est

soumis à un tamisage moléculaire sur colonne de Sépharose 6 B stabilisée en tampon 1 M en NaCl et sensiblement différent (fig. 4).

La fraction I, recueillie au Vo de la colonne, ne possède pratiquement pas d'activité coagulante, mais corrige l'agrégation par la ristocétine de plaquettes lavées et donne un arc de précipitation avec le sérum de Lapin anti-VIII humain. Son taux d' « antigène facteur VIII » et de « cofacteur Willebrand » a donc pu être déterminé (tableau I).

L'activité coagulante VIII est retrouvée dans des fractions élues plus tardivement, souvent répartie dans plusieurs tubes en fin de fraction II ou en début de fraction III. Le tableau I montre que l'activité coagulante de ces fractions n'est pas liée à la présence d'antigène ou de cofacteur Willebrand détectable par les techniques que nous avons utilisées. En étalonnant notre colonne par passage de plusieurs protéines pures de masse moléculaire connue (fibrinogène, IgG, transferrine, albumine) nous pouvons évaluer, d'après leur volume d'exclusion, la masse moléculaire de ces fractions tardives à 225-250 000 daltons.

DISCUSSION

1) Technique de préparation.

Le choix que nous avons fait de la méthode d'Owen et Wagner en raison de sa simplicité s'est avéré satisfaisant. En effet, ce procédé permet d'obtenir, avec un rendement convenable, des fractions peu dénaturées et riches, à la fois, en activité

VIII, en « antigène facteur VIII » et en « cofacteur Willebrand ».

Les fractions F-VIII+ qui possèdent la plus grande activité coagulante spécifique (150 U/mg) sont enrichies 10 000 fois en facteur VIII et leur degré de pureté, évalué par des méthodes immunologiques très sensibles, varie suivant les préparations, entre 85 % et une pureté absolue.

Les performances de cette technique à partir de plasma sont au moins égales à celles des méthodes de Johnson et coll. (6), de Hergold et coll. (4), de Van Mourik et Mochtar (28), de Marchesi et coll. (12), de Legaz et coll. (9), de Shapiro et coll. (23) qui utilisent comme matériel de départ des fractions déjà enrichies en facteur VIII (cryoprécipités, fractions AHG ou fractions IV Hyland).

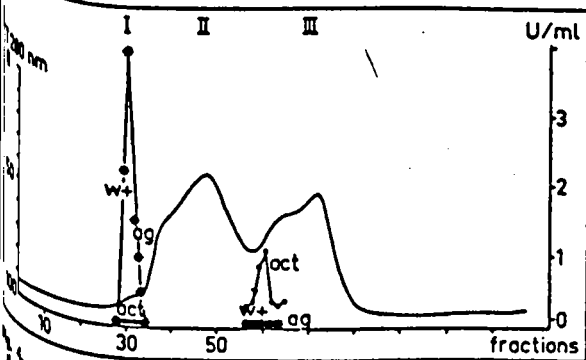
2) Dissociation entre antigène et activité VIII.

Comme de nombreux auteurs (1, 15, 17, 19, 29, 32), nous avons pu séparer, par tamisage moléculaire du précipité P-VIII en tampon de force ionique élevée, d'une part, une fraction appelée « HMW » (High molecular weight) ne possédant plus d'activité coagulante mais contenant l' « antigène VIII » et le « cofacteur Willebrand » et, d'autre part, une fraction de masse moléculaire bien inférieure « LMW » (Low molecular weight) qui corrige la coagulation d'un plasma d'hémophile A majeur mais qui ne forme pas d'arc de précipitation avec les anticorps de Lapin anti- « complexe VIII » humain.

3) Etude de la masse moléculaire du facteur VIII.

a) Constante de sédimentation du « complexe facteur VIII ».

La valeur de la constante de sédimentation S^0 d'une molécule permet, si on connaît son volume spécifique partiel et sa constante de diffusion, de calculer sa masse moléculaire. Les déterminations directes de la constante de sédimentation du facteur VIII sont rares. Dès 1960, cependant, Shulman et coll. (24) ont trouvé une valeur très proche de la nôtre (21 S) pour un des 3 pics qu'ils obtenaient après ultracentrifugation analytique de leur préparation de cofacteur plaquettaire de Bœuf. Plus tard, Schmer et coll. (22) et Hergold et coll. (4) ont tenté une détermination directe de la constante de sédimentation du facteur VIII bovin et humain mais ont échoué, leurs préparations se révélant hétéro-



Chromatographie sur Sépharose 6 B du précipité P-VIII, riche en facteur VIII. Colonne de 2,5 x 70 cm ; tampon imidazole 0,2 M-NaCl 1 M de pH 6,5 ; débit de 20 ml/h ; température : 4°C ; volume des fractions recueillies : 3 ml. (—) : p. 100 de transmission (T) à 280 nm. (○) : activité coagulante VIII en unités/ml (U/ml). (●) : taux d' « antigène facteur VIII », en unités/ml ; Ag. (x) : taux de « cofacteur Willebrand » (deux déterminations) : w.

TABLEAU I. — Propriétés de 2 fractions collectées après chromatographie du précipité P-VIII, riche en facteur VIII, sur colonne de sépharose 6 B stabilisée en tampon 1 M en NaCl (fig. 4).

Fractions	Volume d'exclusion (en ml)	Estimation de la masse moléculaire	Activité coagulante VIII (en U/ml)	Taux d'antigène VIII (en U/ml)	Taux de « cofacteur Willebrand » (en U/ml)
N° 30	90	> 1 000 000	0,05	4	1,8
N° 60	180	250 000	1,10	< 0,10	0

gènes en ultracentrifugation ou formant des agrégats lors de la concentration préalable. Récemment, Legaz et coll. (9) et Hersgold ont publié des valeurs de constante de sédimentation du facteur VIII humain qui sont respectivement de 23,7 et de 26,1 S. Notre valeur est nettement différente ($S_{20}^{1,5 \text{ mg/ml}} = 20,5$) mais il faut remarquer que cette valeur n'est pas corrigée car nous avons déterminé cette constante sur une préparation non concentrée, sitôt sa sortie de colonne, pour éviter, soit la formation d'agrégats, soit une dissociation possible au cours du vieillissement ou de purifications ultérieures. En outre, notre résultat est en accord avec les résultats obtenus par quelques auteurs utilisant l'ultracentrifugation en gradient de saccharose (3, 24, 27).

b) Masse moléculaire du « LMW ». On appelle « LMW » la sous-unité qui, dans le « complexe facteur VIII » est le support de l'activité coagulante et que des auteurs (15, 19, 27, 31) ont caractérisée par chromatographie de tamisage moléculaire ou par ultracentrifugation en milieu de force ionique élevée.

Plusieurs estimations de la masse moléculaire de cette molécule ont déjà été effectuées. Dès 1961, Thélin et Wagner (27) ont observé que la constante de sédimentation de la fraction du plasma de Bœuf douée d'activité coagulante VIII variait avec la force ionique du milieu : elle est de 20,8 S en NaCl 0,154 M, mais de 4,3 S seulement en NaCl 0,4 M. D'autres auteurs travaillant sur le facteur VIII humain, ont fait la même observation mais n'ont pas précisé la valeur de la constante de sédimentation du « LMW » mis en évidence. Pour Weiss et Kochwa (31), cette constante serait proche de celle du fibrinogène (7,9 S). Pour Rick et Hoyer (19), elle se situerait entre le S du fibrinogène et celui de l'albumine et la masse moléculaire du « LMW »

humain serait inférieure à 200 000. Seuls Weiss et coll. (32) ont, jusqu'à présent, publié les résultats de détermination de masse moléculaire des fractions « LMW » qu'ils mettent en évidence à partir de plasma humain soumis à un tamisage moléculaire sur Bio-gel A, 1,5 M en tampon de force ionique élevée. Ils constatent que les sous-unités actives qu'ils obtiennent possèdent des masses moléculaires variables (194 000 à 544 000 daltons). Toutefois, la masse moléculaire des plus petites sous-unités se situe entre 169 000 et 194 000 daltons, valeur bien supérieure à celles trouvées par Owen et Wagner (17) et par Cooper et coll. (1) pour le « LMW » du facteur VIII de Chien. Comme ces derniers auteurs, nous avons remarqué l'étalement du pic d'activité de faible masse moléculaire sur plusieurs tubes collectés. Néanmoins, l'estimation de la masse moléculaire en fonction de leur volume d'exclusion moyen sur Sépharose 6 B permet d'évaluer à 225 000-250 000 daltons la masse moléculaire des fractions « LMW » possédant 100 % d'activité coagulante VIII.

CONCLUSION

L'application au plasma humain de la méthode proposée par Owen et Wagner pour préparer le facteur VIII canin permet d'obtenir, par un procédé simple et rapide, des fractions très enrichies en facteur VIII qui représentent un excellent matériel pour entreprendre l'étude physico-chimique et structurale du facteur VIII dont nous avons rapporté ici les résultats préliminaires.

REMERCIEMENTS. — Nous remercions vivement M. A. VERBERT et Mme M. CONIEZ-LECOQ, technicienne du C.N.R.S., qui ont réalisé les ultracentrifugations analytiques. Ce travail a bénéficié d'une aide du Centre National de la Recherche Scientifique (L.A. n° 217) et de la Fondation pour la Recherche Médicale Française.

STUDIES ON ISOLATION AND MOLECULAR WEIGHT OF HUMAN FACTOR VIII

by C. MAZURIER¹, A. PARQUET-GERNEZ¹, M. GOUEMAND¹
and J. MONTREUIL²

1. Centre Régional de Transfusion Sanguine, 21, rue Camille Guérin, 59000 Lille (France)

2. Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au C.N.R.S. N° 217
(Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués)
Université des Sciences et Techniques de Lille I
B.P. 36, 59650 Villeneuve-d'Ascq (France)

(Path. Biol., 1975, 23, suppl., 11-16)

SUMMARY. — The authors describe some properties of highly-purified factor VIII concentrates isolated from human plasma. The fraction containing « factor VIII-complex » (factor VIII procoagulant activity, factor VIII related antigen and von Willebrand factor) is homogeneous by analytical ultra-centrifugation and its sedimentation coefficient is $S_{20}^{1,5 \text{ mg/ml}} = 20,5$.

By gel filtration in high ionic strength buffer a low molecular weight fraction (LMW) with factor VIII procoagulant activity stronger than plasma's one has been isolated. This LMW fraction contains neither factor VIII related antigen nor von Willebrand factor. Its molecular weight determined by gel filtration is approximatively 250,000.

Medline Key-words : Factor VIII * isolation and purification. — Factor VIII * analysis. — Molecular weight. — Human.

RÉFÉRENCES

1. COOPER H. A., GRIGGS T. R., WAGNER R. H., 1973. — Factor VIII recombination after dissociation by CaCl₂. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 70, 2326-2329.
2. GREEN D., 1971. — A simple method for the purification of factor VIII (antihemophilic factor) employing snake venom. *J. Lab. clin. Med.*, 77, 153-158.
3. HERSGOLD E. J., SPRAWLS S., 1966. — Molecular properties of purified human bovine and porcine antihemophilic globulin. *Fed. Proc.*, 25, 317.
4. HERSGOLD E. J., DAVISON A. M., JANZEN M. E., 1971. — Isolation and some chemical properties of human factor VIII. *J. Lab. clin. Med.*, 77, 185-205.
5. HERSGOLD E. J., 1974. — Properties of factor VIII. In : Progress in hemostasis and thrombosis edited by T. H. Spaet, Grune and Stratton Publishers, New York and London, 2, 99-139.
6. JOHNSON A. J., NEWMAN J., HOWELL M. B., PUSZKIN S., 1967. — Purification of antihemophilic factor for clinical and experimental use. *Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.)*, 26 suppl., 377-388.
7. LAURELL C. B., 1965. — Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Anat. Biochem.*, 10, 358.
8. LAURELL C. B., 1966. — Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analyt. Biochem.*, 15, 45.
9. LEGAZ M. E., SCHMER G., COUNTS R., DAVIE E., 1973. — Isolation and characterization of human factor VIII. *J. biol. Chem.*, 248, 3946-3955.
10. LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J., 1951. — Protein measurements with the Folin-phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193, 265.
11. MANCINI G., CARONARA A. O., HEREMANS J. F., 1965. — Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2, 235.
12. MARCHESI S. L., SHULMAN R. N., GRALNICK H. R., 1972. — Studies on the purification and characterization of human factor VIII. *J. clin. Invest.*, 51, 2151-2161.
13. MAZURIER C., PARQUET-GERNEZ A., GOUEMANT M., 1973. — Action des anticorps anti-facteur VIII sur la rétention des plaquettes aux billes de verre. *Path. Biol.*, 21 suppl., 72-75.
14. MEYER D., DREYFUS M. D., LARRIEU M. J., 1973. — Willebrand factor : immunological and biological study. *Path. Biol.*, 21 suppl., 66-71.
15. MEYER D., JENKINS C. S., DREYFUS M. D., FRESSINAUD E., LARRIEU M. J., 1974. — Relationship between Willebrand factor, Willebrand antigen and factor VIII activity. *Brit. J. Haemat.*, 28, 579-599.
16. OWEN W. G., WAGNER R. H., 1972. — Antihemophilic factor : a new method for purification. *Thrombos. Res.*, 1, 71-88.
17. OWEN W. G., WAGNER R. H., 1972. — Antihemophilic factor : separation of an active fragment following dissociation by salts or detergents. *Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.)*, 27, 502-515.
18. PATEK A. J., TAYLOR F. H., 1937. — Hemophilia II. Some properties of a substance obtained from normal human plasma effective in accelerating the coagulation of hemophilic blood. *J. clin. Invest.*, 16, 113.
19. RICK M. E., HOYER L. W., 1973. — Immunologic properties of AHF subunits produced by salt dissociation. *Blood*, 42, 737-747.
20. SCHAFFNER W., WEISSMANN C., 1973. — A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Ann. Biochem.*, 56, 502-514.
21. SCHEIDEGGER J. J., 1955. — *Int. Arch. Allergy*, 7, 103.
22. SCHMER G., KIRBY E. D., TELLER D. C., DAVIE E. N., 1972. — The isolation and characterization of bovine factor VIII (AHF). *J. biol. Chem.*, 247, 2512-2521.
23. SHAPIRO G. A., ANDERSEN J. C., PIZZO S. V., MAC KEE P. A., 1973. — The subunit structure of normal and hemophilic factor VIII. *J. clin. Invest.*, 52, 2198-2210.
24. SHULMAN S., LANDABURU R. H., SEEGER W. H., 1960. — Biophysical studies of platelet cofactor I preparations. *Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.)*, 4, 336-341.
25. SOULIER J. P., LARRIEU M. J., 1953. — Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des facteurs antihémophiliques A et B. *Sang.*, 24, 205-215.
26. SVEDBERG T., PEDERSEN K. O., 1940. — In : The ultracentrifuge, London, Oxford University Press, 51.
27. THELIN G. M., WAGNER R. H., 1961. — Sedimentation of plasma anti-hemophilic factor. *Arch. Biochem.*, 95, 70-76.
28. VAN MOURIK J. A., MOCHTAR I. A., 1970. — Purification of human anti-hemophilic factor by gel chromatography. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, 95, 70-76.
29. WEISS H. J., HOYER L. W., 1973. — Von Willebrand factor : dissociation from antihemophilic factor procoagulant activity. *Science*, 182, 1149-1151.
30. WEISS H. J., HOYER L. W., RICKLES F. R., VARMA A., ROGERS J., 1973. — Quantitative assay of a plasma factor deficient in VWD that is necessary for platelet aggregation. Relationship to factor VIII procoagulant activity and antigen content. *J. clin. Invest.*, 52, 2708-2716.
31. WEISS H. J., KOCHWA S., 1970. — Molecular forms of antihemophilic globulin in plasma, cryoprecipitate and after thrombin activation. *Brit. J. Haemat.*, 18, 89-100.
32. WEISS H. J., PHILLIPS L. L., ROSNER W., 1972. — Separation of sub-units of AHF by agarose gel chromatography. *Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.)*, 27, 212-219.
33. ZIMMERMAN T. S., RATNOFF O. D., POWELL A. E., 1971. — Immunologic differentiation of classic hemophilia and von Willebrand's disease. *J. clin. Invest.*, 50, 244-254.

- En ce qui concerne la technique de purification utilisée dans ce travail nous insisterons sur les points suivants :

Tout d'abord, le procédé de concentration adopté qui, contrairement à ce qui est annoncé dans le titre, permet ensuite d'isoler, par tamisage moléculaire, non pas le F VIII, mais le complexe F VIII/vWf, présente plusieurs avantages sur la cryoprécipitation généralement utilisée (p.18) : sa facilité et sa rapidité d'exécution, son rendement et le fait qu'il permet d'obtenir parfois une préparation finale, après tamisage moléculaire, qui paraît pure quand elle est analysée en immunoélectrophorèse bidimensionnelle.

Cependant, cette technique présente plusieurs inconvénients qui ont été la cause de la mise au point ultérieure d'autres procédés d'isolement que nous développerons ci-dessous (p.163 et p.184). Tout d'abord, elle n'est pas reproductible et nous avons souligné dans la publication que certaines préparations étaient contaminées par diverses protéines difficiles à éliminer car sans doute adsorbées sur le complexe F VIII/vWf. Deuxièmement, elle est difficilement adaptable à une échelle plus importante ; l'étape de concentration du plasma par dialyse contre du PEG n'est pas envisageable lorsqu'on traite des quantités supérieures à quelques litres de plasma et des essais de concentration du plasma par d'autres procédés, notamment l'ultrafiltration, se sont soldés à l'époque par des échecs.

- En ce qui concerne les résultats de l'ultracentrifugation analytique, ils ne sont que fragmentaires car la constante de sédimentation n'a été déterminée qu'à une seule concentration (1,5 mg/ml) ; néanmoins, la valeur obtenue ($S = 20,5$) se situe entre celles de HERSGOLD (702) et LEGAZ (703) et al. ($S = 16,3$ et $23,7$) qui ne précisent cependant pas la concentration de la préparation analysée. De plus, l'obtention d'un pic unique dans le système optique Schlieren permet d'exclure la présence de contaminants, notamment de lipoprotéines qui, en flottant, donneraient l'image d'un petit pic inversé. Cependant, bien que le pic soit bien symétrique, on ne peut en déduire que la préparation soit iso-moléculaire. Après la publication de ces résultats préliminaires, nous avons pu compléter l'étude en ultracentrifugation analytique par un calcul de S_0 extrapolé à partir des résultats obtenus avec trois concentrations différentes de

F VIII/vwf . La valeur obtenue ($S_0 = 35$) est alors à comparer avec celles de BOUMA (704) et BOLHUIS (705) et al. qui sont respectivement de 27 et 29 S. Maintenant qu'on connaît la polydispersité et la variabilité de formes du F VIII/vwf (p.22 à 24), il semble que les calculs de MM dérivés de sa constante de sédimentation S_0 (p.21) sont discutables car ils sont fondés sur des hypothèses, concernant sa forme et ses propriétés hydrodynamiques, qui n'ont pas été vérifiées.

- Enfin, nous avons confirmé la dissociation du F VIII/vwf en deux entités moléculaires, l'une support de l'activité VIII:C, l'autre support de l'activité VIII R:RCo, de masse moléculaire bien distinctes, par tamisage moléculaire en milieu de force ionique élevée. Les résultats de cette expérimentation sont en accord avec les travaux de nombreux auteurs (p.28) qui permettent de conclure que, au sein du complexe F VIII/vwf les molécules de F VIII et de F vwf sont associées par des liaisons de type non covalent dont la nature n'est cependant pas encore précisée.

II - ETUDE D'UN CONCENTRE THERAPEUTIQUE DE FACTEUR VIII/vWF PREPARE EN CIRCUIT CLOS

Cet article présente, en quelque sorte, le bilan de la fraction thérapeutique concentrée en F VIII:C, préparée au C.R.T.S. de Lille depuis 1979, en rapportant ses caractéristiques obtenues "in vitro" et "in vivo", après injection à des malades hémophiles A ou vWD. Notre travail avait consisté auparavant à mettre au point cette technique, à une époque où les centres de transfusion français ne préparaient pour ce type de malades que des cryoprécipités congelés ou lyophilisés contenant environ 5 U/ml de F VIII:C. L'objectif était d'obtenir un concentré d'environ 25 U/ml puisque c'était là le taux généralement annoncé par les firmes commerciales étrangères qui proposaient donc des produits plus adaptés au traitement à domicile des hémophiles et au traitement des hémophiles avec inhibiteur anti-VIII:C. Comme le cryoprécipité, notre matériel de départ, était préparé à l'époque en circuit clos, nous avons essayé de ne pas perdre cet avantage lors des étapes ultérieures afin d'éviter la filtration stérilisante finale qui nous occasionnait des pertes de rendement causées par des problèmes de colmatage. Le deuxième aspect de ce travail, qui est le plus développé dans cet article, a consisté à comparer notre production à celle des firmes commerciales.

Revue Française de Transfusion et immuno-hématologie
Tome XXV — N° 1. — 1982

Étude d'un concentré thérapeutique de facteur VIII/vWf préparé en circuit clos

par C. MAZURIER, J. MAILLARD, A. PARQUET-GERNEZ
et M. GOUEMAND

Laboratoire d'Hémostase,
Centre de Transfusion Sanguine de LILLE.

LES concentrés de Facteur antihémophilique A (F VIII) de haute pureté définis par une activité coagulante (F VIII:C) supérieure à 25 U/ml et une activité spécifique supérieure à 1 U de F VIII:C/mg de protéine répondent à un besoin thérapeutique chaque fois qu'il est nécessaire de recourir à des doses très élevées de F VIII; l'indication majeure étant la présence d'un anticoagulant anti-VIII.

De nombreuses techniques sont préconisées pour préparer de tels concentrés à partir de cryoprécipités, elles dérivent pour la plupart de la méthode de NEWMAN [1] qui fait appel à des précipitations en présence de polyéthylène glycol. Les opérations se font en circuit ouvert sur des volumes importants de cryoprécipité de départ; elles sont complexes, nécessitent des filtrations successives dont une filtration stérilisante finale. Le rendement en activité coagulante est faible (5 à 15 p. 100) et les concentrés obtenus ne permettent pas le traitement des malades présentant un déficit en facteur Willebrand car en cours de préparation, il y a une perte partielle des propriétés physiologiques du complexe F VIII/facteur Willebrand (vWf).

Manuscrit reçu le 10-10-1981.

MAZURIER C. et coll.

Nous avons mis au point pour notre part un procédé plus simple, pouvant être réalisé entièrement en circuit clos, d'un rendement satisfaisant et préservant au maximum les deux activités physiologiques du complexe F VIII/vWf afin d'obtenir une fraction thérapeutique efficace à la fois chez les hémophiles A et chez les personnes atteintes de maladie de Willebrand.

Nous voulons présenter et discuter ici les résultats des divers contrôles effectués pour vérifier l'efficacité thérapeutique des concentrés obtenus.

MATERIEL ET METHODES

A. — Préparation des concentrés de F VIII/vWf

1. *Préparation du cryoprécipité de départ* par rassemblement, en flacon de 20 l, des cryoprécipités unitaires (jusqu'à 1 000 cryoprécipités d'environ 16 ml) remis chacun en solution avec 10 ml de solution citrate-NaCl.

2. *Préparation du concentré* en deux étapes dont les différentes opérations d'extraction et de décantation sous pression sont réalisées également en local stérile. Les centrifugations, agitations et la congélation sont effectuées en flacon de verre de 500 ml.

1^{re} étape : élimination d'une partie du fibrinogène par addition de glycofolle 1.6 M à des aliquotes de 200 ml du cryoprécipité. Agitation. Addition de 1.5 vol. de NaCl 0.15 M. Agitation. Centrifugation de 15 min. à 900 g et à 10°C. Extraction et rassemblement des surnageants avec filtration intermédiaire. Répartition du surnageant sous des volumes de 350 ml. Congélation à -35°C.

2^e étape : nouvelle cryoprécipitation par décongélation lente à 4°C. Centrifugation de 60 min. à 900 g et à 0°C, lavage des précipités et remise en solution avec un volume de solution tris-citrate calculé en fonction du nombre de poches de plasma de départ (V en ml = nombre de poches - 15 %). Après dissolution à 37°C, rassemblement des concentrés, filtration sur soie puis répartition sous un volume de 20 ml en flacon de 50 ml. Congélation rotative. Lyophilisation.

B. — Contrôle « in vitro » des concentrés de Facteur VIII

1. Solubilité.

La reconstitution se fait après avoir amené préalablement le produit lyophilisé et l'eau de reconstitution à température ambiante. Le flacon est ensuite mis systématiquement au bain-marie à 37°C pendant une durée maximale de 10 mn en conformité avec l'article 42

CONCENTRE THERAPEUTIQUE DE FACTEUR VIII_W

du J.O. du 29 janvier 1976. L'absence de matériel insoluble est vérifiée par mirage puis par passage sur filtre de type Monoject (16 x 3/4i) analogue à celui délivré pour l'injection.

2. Taux de Facteur VIII coagulant (F VIII:C).

L'activité F VIII:C en cours et en fin de production est déterminée par la méthode en 1 temps de SOULIER et LARRIEU [2] dont la méthodologie a été standardisée à la suite d'une séance de travail entre représentants de différents Centres de Transfusion français (Paris, 1977). Après lyophilisation, le F VIII:C des concentrés est contrôlé également par la technique en 2 temps de BIGGS *et al.* [3], après adsorption préalable par l'alumine du plasma témoin et du concentré dilué au 1:5 dans du plasma d'hémophile A majeur. L'activité F VIII:C est calculée par rapport au plasma témoin, pool de 30 à 50 plasmas citratés de donneurs, dont le taux de F VIII:C est déterminé par rapport au deuxième standard de la WHO (73/552 = 1.1 U/ml). La stabilité du F VIII:C de ce pool, conservé moins d'un mois à -80°C, est vérifiée chaque semaine par un dosage vis-à-vis du deuxième plasma standard français (étalon 81 facteur VIII plasma = 1.1 U/ml).

Deux lots de concentrés ont été également dosés par sept laboratoires différents selon une technique en 1 temps dont tous les réactifs (phospholipides, kaolin, plasma d'hémophile, chlorure de calcium, tampon de dissolution et concentré de référence à 20.6 U/ml) ont été standardisés lors d'un travail collaboratif entre 5 Centres de Transfusion européens (Amsterdam 1979, Springe 1980).

3. Taux d'antigène lié au Facteur VIII (F VIII R:Ag).

Les dosages ont été effectués par la technique ELISA décrite précédemment [4] en utilisant comme standard le pool de plasmas témoins décrit ci-dessus dont le taux de F VIII R:Ag a été déterminé par rapport au 1^{er} standard britannique (66/355 = 1.05 U/ml).

4. Taux de cofacteur de la Ristocétine (F VIII R:RCo).

Nous avons utilisé en pratique courante la méthode semi-quantitative de SULTAN et ROSSI [5] et plus exceptionnellement la technique par agrégométrie avec des plaquettes fraîches lavées selon un protocole dérivé de celui de NICHOLLS et HAMPTON [6]. Les résultats exprimés en U/ml sont calculés par rapport aux agglutinations obtenues avec diverses dilutions du pool de plasmas témoins utilisé également pour doser le F VIII:C et F VIII R:Ag dont le taux du F VIII R:RCo est fixé arbitrairement à 1 U/ml.

MAZURIER C. et coll.

5. Electrophorèse bidimensionnelle.

L'étude a été faite sur des échantillons de 10 µl de concentrés de F VIII migrant pendant 6 h sous 4 V/cm dans la 1^{re} dimension et pendant 15 h sous 2 V/cm dans la 2^e dimension où la gélose à 1 p. 100 est additionnée de 0,4 p. 100 (v/v) d'antisérum anti-F VIII R:Ag monospécifique préparé comme décrit précédemment [7].

6. Autres techniques.

Les taux de fibrinogène ont été déterminés par mesure du temps de coagulation en présence de thrombine [8], par pesée, ou encore par immuno-diffusion radiale. Les taux de protéines sont déterminés par la technique au Biuret sur auto-analyseur Abba 100.

Les taux d'anticoagulant anti-F VIII:C ont été déterminés sur plasmas citratés par la technique de KASPER *et al.* [8] et exprimés en unités Bethesda (UB).

Le titrage des anticorps anti-A et anti-B naturels se fait en milieu salin après incubation d'1 h à 22°C. Pour le titrage des anticorps immuns, après neutralisation préalable des anticorps naturels par contact (vol/vol) pendant 1 h à 4°C avec de la substance de Witebski, le titrage se fait par réaction de Coombs indirecte.

C. — Contrôles « in vivo » des concentrés de Facteur VIII

1. Chez les hémophiles.

Quinze hémophiles A majeurs, ne possédant pas d'inhibiteur du F VIII:C ont reçu des concentrés de Facteur VIII, préparés en 1980 ou 1981, à des doses variant entre 20 et 35 U/kg.

Un échantillon de sang est prélevé 1 h après l'injection, sur citrate trisodique 0.13 M à raison de 9 vol. de sang pour 1 vol. d'anticoagulant. Le taux de F VIII:C est déterminé dans les 2 heures suivant le prélèvement sur le plasma obtenu après centrifugation de 30 min. à 3 000 g et à 4°C, par la technique en 1 temps en utilisant comme référence le pool de plasmas témoins décrit ci-dessus. Le taux de F VIII:C, en U/ml, du concentré injecté est estimé en divisant la quantité d'unités de F VIII:C recouvrée « in vivo » par le volume de concentré injecté, la masse plasmatique en ml des malades étant évaluée à 50 fois leur poids en kg puisque dans la formule utilisée [10] pour calculer le nombre d'unités de F VIII:C (d) à injecter à un hémophile : $d = kwi$, la constante k est égale à 50, w étant le poids en kg du malade et i l'augmentation désirée de son taux de F VIII:C en U/ml. Le pourcentage de récupération est le rapport du taux de F VIII:C estimé ainsi sur la base de l'épreuve « in vivo » sur celui déterminé « in vitro ».

CONCENTRE THERAPEUTIQUE DE FACTEUR VIII/vWJ

La demi-vie du facteur VIII:C de nos concentrés a pu être déterminée à 5 occasions lorsque des prélèvements de sang ont pu être effectués plus de 8 h après l'injection. Les plasmas citratés correspondant à des intervalles de temps de 1, 4, 8, 12, 24 et 48 h après injection sont alors congelés dans les 2 heures suivant le prélèvement et les taux de F VIII:C déterminés dans la même série de dosage. La demi-vie du facteur VIII:C est calculée graphiquement à partir de la droite obtenue lorsque l'on reporte le logarithme de l'activité F VIII:C en fonction du temps écoulé depuis l'injection.

2. Chez les patients atteints de maladie de Willebrand (vWD).

Chez 3 de ces malades pour qui le diagnostic de vWD a été porté sur la base des résultats rassemblés dans le *tableau I* nous avons eu la possibilité de faire des contrôles de temps de saignement et parfois, de taux de F VIII:C, F VIII R:Ag et F VIII R:RCo après injection de nos concentrés.

TABLEAU I

Principales caractéristiques biologiques des patients atteints de maladie de Willebrand explorés avant injection des concentrés CRTS-Lille.

PATIENTS	Temps de saignement min.		F VIII:C U/ml	F VIII R:Ag U/ml	F VIII R:RCo U/ml
	(Duke)	(Ivy)			
B.F.	> 10	> 30	0.02	0.01	< 0.05
K.D.	4	> 20	0.08	0.21	0.13
D.L.	8	—	0.08	0.03	0.05
Valeurs normales	< 4	< 10	> 0.5	> 0.5	> 0.5

D. — Matériel

Des lots produits en 1980 et 22 lots produits en 1981 au CRTS de Lille ont été étudiés ainsi que 9 lots de concentrés de Facteur VIII provenant de 8 firmes commerciales différentes (Armour, Cutter, Hubber, Hyland, Immuno, Mérieux, Sanquisan, α -Therapeutic Corporation).

RESULTATS

A. — Préparation des concentrés

Le *tableau II* reproduit un exemple typique des résultats obtenus au cours des différentes étapes de préparation, en les ramenant à 10

MAZURIER C. et coll.

poches de 400 ml de sang au départ. On sait qu'une partie de l'activité F VIII:C est inévitablement perdue lors de la première cryoprécipitation. L'étape de précipitation au glyocolle semble occasionner une perte supplémentaire du F VIII:C mais la présence de glyocolle dans le milieu interfère dans le dosage du F VIII:C et, en fait, peu de F VIII:C est retrouvé dans le précipité. La cryoprécipitation du F VIII:C dans la deuxième étape est très satisfaisante mais le lavage

TABLEAU II

Exemple de valeurs obtenues lors de la préparation de concentrés de facteur VIII (ramenées à un volume de 2 litres de plasma de départ).

	Volume en ml	F VIII:C U/ml	Fibrinogène g/l
Plasma	2 000	0.8	3
Cryoprécipité	160	6.7	6
Surnageant 1 ^{re} étape	400	> 1.6 *	0.6
Précipité 2 ^e étape	10	43	10
Concentré après lyophilisation	10	35.5	10

* Ce taux est sous-évalué étant donnée l'interférence du glyocolle dans le dosage.

du précipité nécessaire pour éliminer une grande partie du glyocolle diminue le rendement. Un calcul effectué sur la base d'un taux de F VIII:C de 0,8 U/ml de plasma de départ et du taux annoncé pour le produit délivré montre que le rendement de 22 préparations successives effectuées à partir de 472 à 1 398 poches (760 en moyenne) varie entre 13.3 et 22.2 p. 100 (16.5 p. 100 en moyenne).

B. — Etude « in vitro » des concentrés

1. Concentrés C.R.T.S. Lille.

Dans les conditions précisées ci-dessus, la dissolution à 37°C est satisfaisante au bout d'un laps de temps compris entre 1 et 10 minutes. Cependant, si ces conditions de température ne sont pas respectées, certains lots présentent des difficultés de remise en solution.

L'activité coagulante F VIII:C des concentrés dosée par les techniques en 1 et 2 temps ainsi que celle annoncée sur l'étiquette (celle-ci étant fondée généralement, comme nous le verrons plus loin, sur la récupération « in vivo ») est reportée dans le tableau III. Par la technique en 1 temps, les résultats sont plus variables et généralement plus élevés que par la technique en 2 temps : 14/22 lots ont une

TABLEAU III

Etude « in vitro » de 22 lots de concentrés de Facteur VIII (CRTS-Lille).

	F VIII:C (U/ml)			Pro- téines (g/l)	Activité spécifique (U F VIII:C/mg protéines)	Fibrinogène (g/l)			U F VIII:C/mg fibrinogène coagulable	Titre d'anticorps			
	Eti- quette	1 tps	2 tps			coag.	pesée	IDR		naturels		immuns	
										Anti-A	anti-B	Anti-A	anti-B
Valeurs	25	23	23	13.7	1.00	6	6	5	1.79	2	0	0	0
à	à	à	à	à	à	à	à	à	à	à	à	à	à
extrêmes	40	57	52	39.7	1.82	20	22	18	4.8	8	16	8	16
Moyennes	29.75	35.5	30.66	24	1.29	9.84	12.5	11.9	3.02	4	4	2	4



MAZURIER C. et coll.

activité en 2 temps inférieure de plus de 10 pour 100 de la valeur trouvée en 1 temps.

Les principales autres caractéristiques de 22 préparations de 1981 sont résumées dans le *tableau III*. Les taux des protéines variant entre 13.7 et 39.7 g/l correspondent à une activité spécifique moyenne de 1.29 U F VIII:C/mg de protéines avec des valeurs comprises, selon les lots, entre 1.00 et 1.82. Les taux de fibrinogène coagulable sont compris entre 6 et 20 g/l (moyenne 9.8) alors que les taux obtenus par la technique par pesée et par IDR sont un peu supérieurs (moyenne 12.5 et 11.9 g/l). Les rapports F VIII:C/fibrinogène calculés sur la base du fibrinogène coagulable varient de 1.79 à 4.8 U F VIII:C/mg de fibrinogène avec une moyenne de 3.02.

Les taux de F VIII R:Ag sont compris entre 70 et 170 U/ml (moyenne 105) et correspondent à des rapports F VIII:C/F VIII R:Ag compris entre 0.176 et 0.490 (moyenne 0.303). La présence de formes

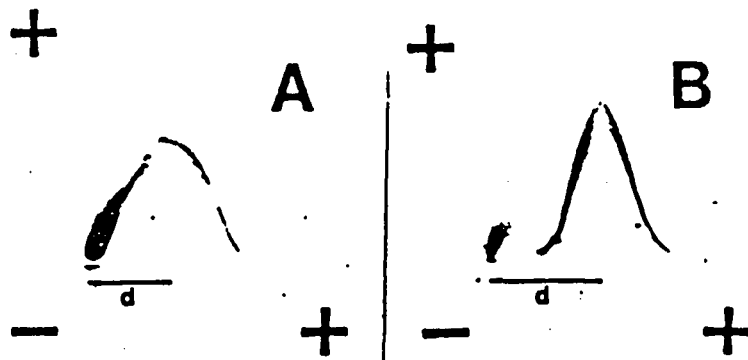


FIG. 1. — Etude en électrophorèse bidimensionnelle d'un concentré de facteur VIII CRTS-Lille (A) et d'un concentré de facteur VIII commercial (B).

très polymérisées de facteur VIII, support de l'activité Willebrand a été recherchée par électrophorèse bidimensionnelle. La figure 1A illustre le fait que nos concentrés ont une mobilité électrophorétique faible, la distance entre le dépôt et le haut de pic (d) est en moyenne de 20 mm (19 à 25 mm) et donne un Rf par rapport à l'albumine voisin de 0.25. Pour 10 de nos lots on a calculé le pourcentage de la fraction du pic délimitée par les formes moléculaires de mobilité faible (inf. à 20 mm) par rapport à la surface totale du pic, il varie entre 34 et 60 p. 100 avec une valeur moyenne de 45 p. 100.

Le taux de F VIII R:RCo déterminé par une technique semi-quantitative sur les 22 lots donne des valeurs entre 12.5 et 100 U/ml

CONCENTRE THERAPEUTIQUE DE FACTEUR VIII/vWJ

33

(moyenne = 65). La technique agrégométrique avec des plaquettes fraîches donne des résultats plus précis, les valeurs obtenues sur 7 de ces lots varient entre 35 et 74.3 U/ml (moyenne = 57.2).

Les titres d'anticorps anti-A et anti-B sont en général faibles. Si on exclut des 22 lots étudiés 4 lots préparés exclusivement à partir de plasma de donneurs de groupe A, les titres d'anti-A varient entre 2 et 8, les titres d'anti-B de 0 à 16 (Tabl. III).

Afin de contrôler nos résultats, nous avons soumis un lot de notre production à 6 laboratoires de différents Centres de Transfusion européens. La moyenne des temps de dissolution, qui sont variables étant donné que chaque laboratoire travaille dans des conditions de température différentes, est de 10 mn. Les caractéristiques déterminées par les contrôles sont reportées dans le tableau IV. La moyenne des valeurs de F VIII:C trouvées à Lille (29.1 U/ml) est très proche de la moyenne (26. U/ml) de l'ensemble des résultats obtenus par les diverses techniques. Les activités spécifiques trouvées donnent une moyenne de 2.14 U F VIII:C/mg de protéines et de 3.94 U F

TABLEAU IV

Etude comparative par 7 laboratoires de contrôle différents d'un lot de concentré de Facteur VIII (CRTS-Lille).

		Valeurs extrêmes des 6 autres laboratoires	Valeur trouvée à Lille	Valeur moyenne (*)
F VIII:C (U/ml)	Méthode standardisée 1 temps	25.1 à 29.3	32	28 (7)
	Méthode habituelle en 1 temps	27.1 à 30	30	28.7 (4)
	Méthode en 2 temps	22.9 à 25.3	25.3	24 (3)
Protéines (g/l)		9.6 à 16	14	13.4 (4)
Fibrinogène (g/l)		5 à 7.5	7	6.7 (6)
Activité spécifique du F VIII:C	U/mg protéines	1.73 à 2.80	2.08	2.14 (4)
	U/mg fibrinogène coagulable	2.12 à 5.42	4.16	3.94 (6)

(*) Le nombre de résultats pris en compte pour calculer la moyenne est noté entre parenthèses.

MAZURIER C. et coll.

VIII:C/mg de fibrinogène, ce qui est également voisin des valeurs calculées à partir de nos résultats.

2. Concentrés de firmes commerciales.

Les résultats que nous avons obtenus sur 9 lots provenant de 8 firmes commerciales différentes sont rassemblés dans le tableau V.

L'activité F VIII:C annoncée par le fabricant varie entre 25 et 43.6 U/ml, nos résultats sont proches de ces valeurs pour la plupart des lots (écart inférieur à 10 p. 100) sauf pour les lots F, G, et H pour lesquels ils sont plus élevés. Les résultats obtenus par la technique en 2 temps sont inférieurs à ceux obtenus par la technique en 1 temps pour 4/6 lots analysés par les deux techniques. Enfin, les activités spécifiques, calculées sur la base du taux de F VIII:C déterminé par les 2 techniques sont en moyenne de 1.12 et de 1.02 U F VIII:C/mg de protéines avec des valeurs extrêmes de 0.57 et 2.61. Les rapports F VIII:C/mg de fibrinogène coagulable varient eux, entre 1.46 et 6.79.

Les taux de F VIII R:Ag donnent des rapports F VIII:C/F VIII R:Ag compris entre 0.20 et 0.42 (moyenne = 0.32). Les taux de F VIII R:RCo, obtenus par la technique semi-quantitative sur 6 échantillons différents, sont compris entre 6.25 et 75 U/ml (moyenne = 32.3). L'électrophorèse bidimensionnelle a été effectuée sur 7 des échantillons. La figure 1 B montre l'allure des pics généralement obtenus. Les pourcentages de la fraction des pics délimitée par les molécules de mobilité inférieure à 20 mm ont été calculés, ils varient de 2 à 22.5 p. 100 avec une moyenne de 10 p. 100.

Les taux d'anticorps naturels anti-A et anti-B ont été déterminés sur 7 échantillons. En dehors du lot E préparé à partir de plasma de groupe A, le titre des anti-A varie entre 16 et 64. Les anti-B ont un titre variant entre 8 et 16 (Tabl. V).

C. — Contrôles « in vivo » des concentrés CRTS Lille

1. Etude chez les hémophiles A.

Le taux du F VIII:C de 25 lots de concentrés produits de 1980-81, calculé sur la base de l'activité F VIII:C retrouvée chez les hémophiles 1 h après injection, se situe entre 18.6 et 33.1 U/ml (moyenne 26.13 U/ml). Le taux de récupération « in vivo » calculé sur la base des dosages « in vitro » en 1 temps varie entre 29 et 102 % (moyenne 86.2 %). Il apparaît ainsi que certains concentrés sont surévalués par la technique en 1 temps alors que la technique en 2 temps donne des résultats assurant une récupération « in vivo » supérieure à 60 % dans 92 p. 100 des cas.

TABLEAU V

Etude « in vitro » de 9 lots de concentrés de Facteur VIII provenant de 8 firmes commerciales différentes.

Lots	Solubilité à 37°C (min)	F VIII:C (U/ml)			Protéines (g/l)	Act. spéci- fique		Fibrinogène (g/l)			U F VIII:C/ mg fibrino- gène coagul.		Titres d'anticorps naturels	
		fabricant	1 tps Lille	2 tps Lille		(U F VIII:C/ mg protéines)		coag.	pesée	I.D.R.	1 tps	2 tps	anti-A	anti-B
						1 tps	2 tps							
A	> 5	32.7	34	—	43	0.79	—	15.2	22	34	2.24	—	64	16
B	> 10	36.3	34	24.25	13	2.61	1.86	9.5	9.3	12.8	3.58	2.55	—	—
C	> 10	30	31	21	24	1.29	0.88	10	8	11.8	3.1	2.1	—	—
D	> 5	28.25	—	29.5	23	—	1.28	6	10.5	16	—	4.92	16	16
E	> 10	25	28.5	30	35	0.81	0.86	8	11.9	20.4	3.56	3.75	0	8
F	> 5	25.7	36	—	33	1.09	—	5.3	9.6	12	6.79	—	16	8
G	* incomplète	43.6	67.5	61	65	1.04	0.94	20.5	26	39	3.29	2.97	64	16
H	> 10	50	70	52.5	85	0.82	0.62	36	37	40	1.94	1.46	32	16
I	> 10	25	27	32	47	0.57	0.68	16.5	23	20.9	1.64	1.94	16	8
Moyenne	32.95	41	35.75	41	1.12	1.02	14.1	17.5	23	3.27	2.81	30	13

(*) Particules persistant après 10 min. à 37°C.

BU
LILLE

MAZURIER C. et coll.

La figure 2 représente les valeurs de F VIII:C obtenues à des intervalles de temps variant entre 1 h et 48 h après l'injection d'un de nos lots de concentrés à un hémophile A majeur. La demi-vie a pu être ainsi calculée pour 5 lots différents de concentrés. La demi-vie moyenne est de 11.8 h, les résultats se situant entre 8 h et 15 h, mais il est à noter que cette étude n'a pu être effectuée qu'au cours d'épisodes hémorragiques nécessitant l'hospitalisation des malades.

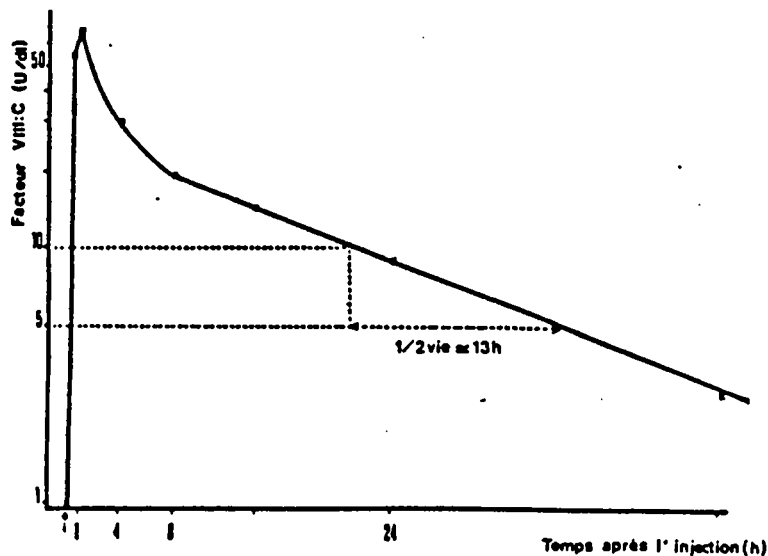


FIG. 2. — Courbe de survie du F VIII:C chez un hémophile A majeur ayant reçu un concentré CRTS-Lille à la dose de 30 U F VIII:C/kg.

2. Etude chez les patients atteints de maladie de Willebrand.

Le taux de cofacteur Willebrand de 2 lots de concentrés a été déterminé sur la base des résultats obtenus chez 2 malades (B.F. et K.D.) 1 h après injection. Les résultats sont de 37.6 et de 46 U/ml, ce qui correspond respectivement à une récupération de 107 et 109 % du taux de F VIII R:RCo déterminé « in vitro » par agrégométrie avec plaquettes fraîches lavées. Les valeurs des diverses activités liées au facteur VIII chez un des malades (B.F.) avant, 1 h et 20 h après injection de concentrés sont reportées dans la figure 3.

D. — Efficacité thérapeutique

1. Chez les malades présentant un déficit en F VIII:C

Utilisés dans des circonstances nécessitant des posologies élevées : accidents hémorragiques graves ou traitements pré et post-opératoires, ces concentrés de facteur VIII ont fait la preuve de leur efficacité en permettant d'arrêter ou d'éviter des hémorragies qui auraient nécessité l'injection d'un volume cinq fois plus élevé de cryoprécipité.

CONCENTRE THERAPEUTIQUE DE FACTEUR VIII (VW)

Ils ont notamment été utilisés à plusieurs reprises pour juguler des hémorragies chez 4 malades avec anticoagulant anti-VIII:C (7 accidents hémorragiques dont 2 hématomes du psoas chez 3 hémophiles A majeurs avec inhibiteur et chez 1 malade ayant développé un anti-VIII post-partum). Chez certains de ces malades des plasmaphères intensives ont été réalisées pour diminuer préalablement les taux d'anti-VIII:C (s'élevant parfois jusque 120 UB/ml), aux environs de 15-20 UB/ml. Dans ces conditions, les doses massives de facteur VIII injectées ont entraîné chaque fois une nette amélioration clinique et parfois, ainsi que le montre en exemple la figure 4 une saturation complète de l'anticoagulant et l'apparition d'activité coagulante F VIII:C.

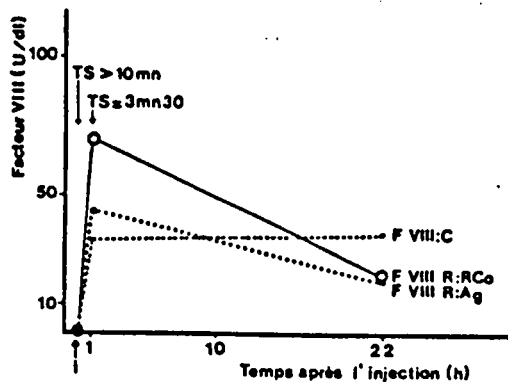


FIG. 3. — Résultats des diverses activités liées au facteur VIII chez un malade présentant un vWD sévère, avant et après injection (— i) d'un concentré CRTS-Lille (16 U F VIII:C/kg et 35 U F VIII R:RCO/kg).

philes A majeurs avec inhibiteur et chez 1 malade ayant développé un anti-VIII post-partum). Chez certains de ces malades des plasmaphères intensives ont été réalisées pour diminuer préalablement les taux d'anti-VIII:C (s'élevant parfois jusque 120 UB/ml), aux environs de 15-20 UB/ml. Dans ces conditions, les doses massives de facteur VIII injectées ont entraîné chaque fois une nette amélioration clinique et parfois, ainsi que le montre en exemple la figure 4 une saturation complète de l'anticoagulant et l'apparition d'activité coagulante F VIII:C.

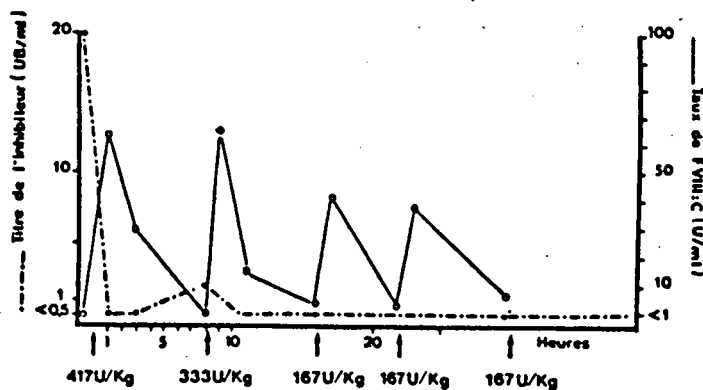


FIG. 4. — Titre de l'anticoagulant anti-VIII C et taux de F VIII:C au cours du traitement, pour un hématome du psoas, d'un hémophile avec inhibiteur : 1^{re} injection de 25 000 U de F VIII:C, 2^e de 20 000 U puis 10 000 U toutes les 8 h pendant 4 jours.

MAZURIER C. et coll.

2. Chez les malades présentant un déficit en F VIII R:RCo

Outre le fait que ces concentrés sont utilisés avec satisfaction par plusieurs malades se traitant à domicile, nous avons pu observer, chez un malade (K.D.) présentant des gingivorragies persistantes depuis 48 h, l'arrêt définitif de l'hémorragie 10 mn après injection de 34 U F VIII R:RCo/Kg mais le temps de saignement effectué par la technique d'Ivy 1 h après l'injection, bien que nettement diminué quantitativement, restait supérieur à 20 mn. L'hémorragie au niveau d'une amygdale d'un deuxième malade (D.L.) s'est également arrêtée après injection de 20 U/kg de F VIII R:RCo et de 15 U/kg de F VIII:C, le temps de saignement (Duke) qui n'a pu être effectué que 15 mn après injection, étant corrigé à 3 min. 30. Enfin chez un troisième patient (B.F.) le temps de saignement par la technique de Duke, habituellement supérieur à 10 mn, était encore corrigé (2 mn 30) 1 h après injection de 16 U/kg de F VIII:C et de 35 U/kg de F VIII R:RCo (Fig. 3).

DISCUSSION

Les critères de qualité exigés pour les concentrés thérapeutiques de Facteur VIII sont nombreux, l'élément capital pour le traitement des hémophiles A étant sans aucun doute un taux élevé de F VIII:C. On peut ensuite citer : une activité spécifique élevée, une solubilité rapide, une taux faible d'anticorps anti-A et anti-B, un rapport F VIII:C/F VIII R:Ag et F VIII:C/F VIII C:Ag le plus proche possible de 1 et enfin, un taux élevé de F VIII R:RCo pour que ces fractions soient susceptibles d'être efficaces chez les patients atteints de maladie de Willebrand.

En ce qui concerne le taux de F VIII:C de nos concentrés, il se situe entre 25 et 40 U/ml, valeurs au moins égales à celle requise par les normes françaises (25 U/ml \pm 20 %). Il est comparable aux taux obtenus pour la plupart des concentrés commerciaux que nous avons étudiés, les 2 lots d'activité supérieure (G et H), ayant un taux de protéines très élevé qui retentit sur leur activité spécifique. Néanmoins les difficultés de dosage sont certaines étant donné notamment l'inexistence d'un standard concentré de facteur VIII, et nous observons parfois, comme bien d'autres (11-13) des discordances entre les résultats obtenus par les techniques en 1 et 2 temps. C'est pourquoi nous avons tenu à vérifier nos résultats, d'une part en les comparant à ceux de 6 autres laboratoires de contrôle de divers Centres de Transfusion européens confrontés au même problème, d'autre part en effectuant un contrôle « in vivo ». Ce dernier contrôle est destiné,

CONCENTRE THERAPEUTIQUE DE FACTEUR VIII(VW)

non pas à établir les taux exacts de F VIII:C de chacun de nos lots, mais à déterminer, en cas de discordances dans les dosages effectués « in vitro », laquelle des techniques en 1 ou 2 temps, doit servir de base à l'étiquetage, pour que l'activité annoncée soit recouvrée, de façon satisfaisante chez les hémophiles traités. Nous n'avons donc pas, dans cette étude, établi précisément la masse plasmatique de chacun des malades mais adopté comme base de calcul qu'elle est égale à 50 fois son poids en kg puisque c'est une formule fréquemment utilisée pour fixer la quantité d'unités de F VIII:C à injecter. Les taux de F VIII:C ainsi estimés sur la base des prélèvements effectués chez des hémophiles A majeurs 1 h après injection varient entre 18.6 et 33.1 U/ml. Les pourcentages de récupération calculés à partir de ces valeurs et des résultats obtenus par la technique en 2 temps, bien que variables (ce qui n'est pas étonnant puisqu'un même lot peut donner des résultats différents d'un hémophile à l'autre [14]), sont en moyenne de 80 p. 100. Ce résultat est comparable à ceux publiés dans la littérature [14, 15] ainsi qu'à ceux de OVER [16] qui a étudié la récupération de la radioactivité après injection de Facteur VIII marqué à l'¹²⁵I. De même, la demi-vie de l'activité F VIII:C (moyenne : 11.8 h) est semblable à celle obtenue avec d'autres concentrés.

Pour ce qui est de l'activité spécifique du F VIII:C de notre produit, les résultats exprimés en U/mg des protéines sont toujours supérieurs à 1, limite inférieure préconisée pour définir un concentré de haute pureté [17]. Il est à noter que, parmi les concentrés commerciaux que nous avons contrôlés, seuls les lots des formes B, C et D satisfont à ce critère. Le taux de fibrinogène persistant dans les divers concentrés apparaît plus élevé lorsqu'il est déterminé par IDR ou par pesée plutôt que sur la base du temps de thrombine. Ceci peut s'expliquer d'une part parce qu'une partie du fibrinogène étant dénaturée celui-ci coagule moins vite et, d'autre part, parce que le caillot formé est alourdi par la présence de fibronectine à un taux élevé dans la plupart de ces préparations. Le taux de fibrinogène coagulable de nos concentrés et les rapports F VIII:C/fibrinogène qu'on en déduit, bien que variables, se situent dans les limites, d'ailleurs très larges, trouvées pour les concentrés commerciaux.

La solubilité de nos concentrés est moins bonne que celle de certains concentrés commerciaux (A, D, F) qui se dissolvent instantanément à température ambiante, mais comparable à celle de la majorité (5/9) des concentrés étudiés qui nécessitent un séjour de 10 min. au bain-marie à 37°C.

Les taux d'anticorps anti-A et anti-B de tous nos lots se situent en deçà du titre limite de 32 fixé par les normes françaises. Les

MAZURIER C. et coll.

taux d'anticorps naturels sont inférieurs à ceux de la plupart des concentrés commerciaux étudiés, et nous n'avons constaté aucun problème d'hémolyse après injection de doses parfois très élevées de notre produit (jusqu'à 50 000 U/j chez un hémophile de groupe sanguin A ayant un inhibiteur).

En ce qui concerne le rapport *F VIII:C/F VIII R:Ag* qui est d'autant plus élevé que l'activité coagulante du complexe *F VIII/vWf* est mieux préservée [18], nous obtenons là aussi des valeurs voisines de celles des concentrés commerciaux.

Par contre, l'activité Willebrand est beaucoup mieux préservée dans nos préparations. En effet, celles-ci sont caractérisées par un taux relativement élevé de *F VIII R:RCo* puisque les dosages semi-quantitatifs que nous avons réalisés sur 22 lots donnent une moyenne de 65 U/ml. De plus, ALLAIN *et al.* [15] avaient déjà noté que parmi les concentrés de pureté intermédiaire ou de haute pureté, seul notre produit donnait en agrégométrie des droites parallèles à celles obtenues avec le plasma de référence. Les taux de *F VIII R:RCo* que nous avons vu préciser sur 7 de nos lots sont toujours supérieurs à 35 U/ml. Ces taux obtenus « *in vitro* » ont été vérifiés à 2 occasions « *in vivo* », ainsi que le préconisent MC CUE *et al.* [19], par comparaison avec les taux de *F VIII R:RCo* obtenus chez des patients atteints de maladie de Willebrand 1 h après injection. De plus, alors que certains auteurs [14-20] ont montré que plusieurs concentrés pourtant support d'une activité *F VIII R:RCo* ne sont pas recommandés pour traiter les patients atteints de maladie de Willebrand, notre préparation peut corriger le temps de saignement de ces malades et est efficace au point de vue clinique. Ceci s'explique du fait qu'elle contient, ainsi que l'a montré l'étude en électrophorèse bidimensionnelle, une grande proportion de molécules hautement polymérisées nécessaires à l'activité Willebrand [21-22]. Nous pensons que, contrairement à certaines techniques de préparation [1] faisant intervenir une étape de précipitation au PEG qui, en même temps que le fibrinogène, élimine les formes très polymérisées du *F VIII/vWf*, notre technique qui fait appel à une 2^e cryoprécipitation du *F VIII:vWf* favorise l'enrichissement du concentré en formes très polymérisées tout comme la 1^{re} cryoprécipitation.

Ainsi, la technique de préparation de concentrés que nous avons mise au point avec, pour base de travail, d'établir un protocole en circuit stérile évitant d'une part l'apparition de substances pyrogéniques, d'autre part, la nécessité d'une filtration stérile finale à l'origine d'une diminution supplémentaire du rendement est adaptable au traitement journalier de plusieurs centaines d'unités de plasma frais congelé. L'ensemble des contrôles effectués sur cette production

CONCENTRE THERAPEUTIQUE DE FACTEUR VIII(vWf)

a montré qu'avec un rendement moyen de 16.5 p. 100 nous préparons des concentrés ayant les mêmes caractéristiques « in vitro » et « in vivo » que la plupart des concentrés thérapeutiques commerciaux. En outre, nos concentrés ont la particularité d'avoir une activité Willebrand relativement élevée, ce qui devrait leur permettre d'être aussi efficaces chez les patients atteints de maladie de Willebrand que chez les hémophiles A.

RESUME

Un procédé original de préparation en circuit clos de concentrés de Facteur VIII a été mis au point. Il est fondé sur l'élimination d'une partie du fibrinogène des cryoprécipités par précipitation au glyocolle et sur l'enrichissement en Facteur VIII par une deuxième cryoprécipitation permettant d'obtenir un taux de Facteur VIII coagulant supérieur à 25 U/ml avec un rendement voisin de 16 p. 100. Les différentes caractéristiques « in vitro » des préparations ainsi obtenues (solubilité, taux de protéines et de fibrinogène, activité spécifique, taux d'anticorps anti-A et anti-B...) se situent dans les limites des résultats trouvés pour divers concentrés commerciaux que nous avons contrôlés à titre comparatif. En outre, nos concentrés ont la particularité d'être enrichis à la fois en Facteur VIII coagulant (F VIII:C) et en facteur Willebrand (F VIII:vWf) et une étude « in vivo » a montré qu'ils sont efficaces pour traiter, non seulement les hémophiles A, mais également les patients atteints de maladie de Willebrand.

SUMMARY

An original procedure of preparation in a closed system of high purity Factor VIII concentrate is presented. Starting from cryoprecipitates, this method involves a first step of partial removal of fibrinogen by glycine precipitation (1.6 M.) and a second step of Factor VIII concentration by cryoprecipitation. The yield is 16.5% of plasmatic F VIII:C (0.8 u/ml.). Several batches of concentrates thus prepared are compared « in vitro » to 9 other commercially available concentrates from 8 different manufactories. The results show that most of the characteristics of our concentrate are within the range of specifications of other commercially available high-purity F VIII concentrate : F VIII:C activity (CRTS Lille concentrate: 25-40 U/ml.; other concentrates: 25-50 U/ml) solubility, specific activity (CRTS Lille concentrate: 1.0-1.82 U F VIII:C/mg protein and 1.79-4.8 U F VIII:C/mg clottable proteins; other concentrates: 0.53-2.79

MAZURIER C. et coll.

U F VIII:C/mg protein and 1.39-4.84 U F VIII:C/mg clottable proteins), isoagglutinin titers (CRTS Lille concentrate: 2-8 anti-A, 0-16 anti-B; other concentrates: 0-64 anti-A, 8-16 anti-B) F VIII C/F VIII R:Ag ratios (CRTS Lille concentrate: 0.18-0.49; other concentrates: 0.20-0.42). Furthermore F VIII R:Ag electrophoretic mobility studied by crossed immunoelectrophoresis and F VIII R:RCo assays provide evidence that very high molecular weight multimeric forms of F VIII/vWf which support vWf activity are present in our concentrate. « In vivo » study and clinical efficacy in vWd patients confirm these results and show that our concentrate is appropriate for the treatment of patients with F VIII:C or F VIII R:RCo deficiency.

REMERCIEMENTS. — Nous remercions les Centres de Transfusion de Amsterdam, Baden-Baden, Bern, Helsinski, Paris et Springe dont les résultats consécutifs à un échange de concentrés de facteur VIII (rapport de Berne, 1981) sont résumés dans le tableau IV.

M^{me} le Dr. C. MAZURIER,
C.R.T.S.,
21, rue Camille Guérin,
59012 LILLE.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] NEWMAN J., JOHNSON A.J., KARPATKIN M.H. and PUSZKIN S. — Methods for the production of clinically intermediate and high-purity factor VIII concentrates. *Brit. J. Haemat.*, 21, 1, 1971.
- [2] SOULIER J.P. and LARRIEU M.J. — Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des fractions antihémophiliques A et B. *Le Sang*, 24, 205, 1953.
- [3] BIGGS R.M., EVELING J. and RICHARDS G. — The assay of antihemophilic globulin activity. *Brit. J. Haemat.*, 1, 20, 1955.
- [4] MAZURIER C., PARQUET-GERNEZ A. and GOUEMAND M. — Dosage de l'antigène lié au facteur VIII par la technique ELISA. *Pathol. Biol.*, Suppl. 25, 18, 1977.
- [5] SULTAN Y. et ROSSI J. — Méthode de mesure de l'activité Willebrand sur plaque de microtitration. *Nouv. Presse Méd.*, 6, 44, 1977.
- [6] NICHOLLS D.G. and HAMPTON J.R. — Density gradient separation of human platelets from plasma and the role of plasma in adenosine diphosphate induced platelet electrophoretic mobility changes. *Thromb. Diath. Haemorr.*, 27, 425, 1972.
- [7] MAZURIER C., PARQUET-GERNEZ A., SAMOR B. et GOUEMAND M. — Etude de l'antigène lié au facteur VIII (FVIII R:Ag). Purification par chromatographie d'affinité. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 288, 1431, 1979.

CONCENTRE THERAPEUTIQUE DE FACTEUR VIII/vWf

- [8] VON CLAUSS A. — Gerinnungs physiologische schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haemat.*, 17, 237, 1957.
- [9] KASPER C.K. *et al.* — A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 34, 869, 1975.
- [10] INGRAM G.I.C. — Calculating the dose of factor VIII in the management of haemophilia. *Brit. J. Haemat.*, 48, 351, 1981.
- [11] KIRKWOOD T.B.L. and BARROWCLIFFE T.W. — Discrepancy between one-stage and two-stage assay of factor VIII:C. *Brit. J. Haemat.*, 40, 333, 1978.
- [12] ALLAIN J.P., VERRONST F. and SOULIER J.P. — One or two stage assay for factor VIII? *Lancet*, i, 1076, 1979.
- [13] NILSSON I.M., KIRKWOOD T.M. and BARROWCLIFFE T.W. — In vivo recovery of factor VIII: A comparison of one-stage and two-stage assay method. *Thromb. and Haemost.*, 42, 1230, 1979.
- [14] NILSSON I.M. and HEDNER V. — Characteristics of various factor VIII concentrates used in treatment of haemophilia A. *Brit. J. Haemat.*, 37, 543, 1977.
- [15] ALLAIN J.P., VERRONST F. and SOULIER J.P. — Comparative in vitro and in vivo study of various concentrates. *Vox Sang.*, 38, 68, 1980.
- [16] OVER J., SIXMA J.J., DOUCET DE BRUINE M.H., TRIESCHNIGG A.M., VLOOSWIJK R.A., BEESERVISER N.H. and BOUMA B.N. — Survival of ¹²⁵Iodine-labeled factor VIII in normals and patients with classic haemophilia. *J. Clin. Invest.*, 62, 223, 1978.
- [17] SMITH J.K. and BIDWELL E. — Therapeutic materials used in the treatment of coagulation defects. *Clin. Haematol.*, 35, 183, 1979.
- [18] BARROWCLIFFE T.W., KEMBALL-COOK G., MORRIS G., HOLT J.C., FURLONG R.A. and PEAKE I.R. — Factor VIII related activities in therapeutic concentrates. *J. Lab. Clin. Med.*, 97, 429, 81.
- [19] MC CUE M.J., BROSSOIT A.D., MARMER D.J. and HEAD D.R. — Von Willebrand factor (VIII vWf) in lyophilized factor VIII concentrates. *Amer. J. Haemat.*, 9, 39, 1980.
- [20] BLATT P.M., BRINKHOUS K.M., CULP H.R., KRAUSS J.S. and ROBERTS H.R. — Antihemophilic factor concentrate therapy in von Willebrand disease. Dissociation of bleeding-time factor and ristocetin-cofactor activities. *J. Amer. Med. Ass.*, 236, 2770, 1976.
- [21] GRALNICK H., COLLIER B. and MARCHESI S. — Studies of the human factor VIII/von Willebrand factor protein. I: comparison of the protein found in normal, von Willebrand's disease and haemophilia. *Thromb. Res.*, 6, 93, 1975.
- [22] SIXMA J.J., OVER J. and BOUMA B.N. — Predominance of normal low molecular weight forms of factor VIII in « variant » von Willebrand's disease. *Thromb. Res.*, 12, 929, 1978.
- [23] MEYER D., OBERT B., PIETU G., LAVERGNE J.M. and ZIMMERMAN T.S. — Multimeric structure of factor VIII/von Willebrand's disease. *J. Lab. Clin. Med.*, 95, 590, 1980.
- [24] OVER J., BOUMA B.N., Van MOURIK J., SIXMA J.J., VLOOSWIJK R. and BAKKER-WOUDENBERG I. — Heterogeneity of human factor VIII: Characterization of factor VIII present in the supernatant of cryoprecipitate. *J. Lab. Clin. Med.*, 91, 32, 1978.

Le bilan de notre production montre que le procédé que nous avons mis au point permet d'obtenir, avec un rendement moyen de 16 % fondé sur le nombre d'unités de F VIII:C, un concentré contenant au moins 25 U de F VIII:C/ml pouvant se classer, par comparaison avec les autres préparations thérapeutiques que nous avons pu étudier, parmi les produits dits de "haute pureté" car ayant une activité spécifique (U F VIII:C/mg de protéines) supérieure à 1. Les autres caractéristiques de notre concentré, et particulièrement son taux d'anticorps anti-A et anti-B, sont satisfaisantes et il est donc tout à fait valable pour traiter les hémophiles. Les expérimentations réalisées "in vitro" et "in vivo" ont montré, en outre, que notre préparation a la particularité d'être riche en F vWf, encore doué d'activité VIII R:vWf, et d'être tout à fait adaptée au traitement de patients atteints de vWD, contrairement aux concentrés préparés par d'autres méthodes.

III - ETUDE DE L'ANTIGENE LIE AU FACTEUR VIII (F VIII R:Ag)- PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Devant les difficultés rencontrées pour appliquer le protocole décrit précédemment (p.155 à 160) à des grandes quantités de plasma, et grâce aux travaux effectués pour mettre au point une préparation de concentrés thérapeutiques de F VIII (p.164) nous avons, vers 1978, décidé d'utiliser le procédé suivant pour obtenir des fractions (S-VIII) enrichies en F VIII/vWf : le cryoprécipité (obtenu à partir de plasma frais congelé à -35°C et décongelé à une température inférieure à 7°C) est débarassé d'une partie de son fibrinogène par addition de 12 p.100 de glycoColle ; après centrifugation, le surnageant est congelé à -35°C puis décongelé à température inférieure à 7°C ; le F VIII/vWf reste insoluble durant cette 2ème étape de cryoprécipitation et est récupéré par centrifugation. Ce procédé, complété par une étape de tamisage moléculaire sur Biogel A-50M, permet d'obtenir une fraction très purifiée en F VIII/vWf (Vo - VIII) qui, bien qu'elle satisfasse en général à tous les critères de pureté mis au point précédemment (p.155), n'induit cependant pas uniquement des anticorps monospécifiques lorsqu'elle est injectée au lapin. Notre but étant alors d'avoir une préparation pure afin d'en déterminer, sans aucun risque d'erreur du à la présence de traces de contaminants, la composition chimique, nous nous sommes orientés vers la chromatographie d'affinité. Etant donné que nos études biochimiques étaient un préalable aux études ultérieures permettant d'élucider les relations structure-activité du F VIII/vWf, nous avons choisi, non pas de fixer ces molécules ce qui aurait pu entraîner des risques de dénaturation ou de dissociation lors de leur élution, mais de fixer leurs contaminants. Comme nous n'étions pas sûr d'avoir identifié tous les contaminants du F VIII/vWf dans la fraction Vo - VIII nous avons décidé de préparer un antiserum hétérologue dirigé contre toutes les protéines plasmatiques, mais ne contenant pas d'anticorps anti-VIII R:Ag, en utilisant le plasma d'un malade vWD sévère, comme matériel immunisant.

BIOCHIMIE. — *Étude de l'antigène lié au facteur VIII (F VIII R : Ag). Purification par chromatographie d'immuno-affinité.* Note (*) de Claudine Mazurier, Armelle Parquet-Gernez, Bruno Samor, Maurice Goudemand et Jean Montreuil, présentée par Jean Bernard.

La chromatographie d'affinité sur immunoglobulines de Lapin immunisé avec un plasma de malade dépourvu de VIII R : Ag permet d'éliminer de préparations enrichies en facteur VIII les derniers contaminants. L'activité biologique et les critères de pureté du facteur VIII R : Ag ainsi préparé sont présentés.

Immuno-affinity chromatography on immunoglobulins from a rabbit immunised with the plasma of a patient devoid of factor VIII R : Ag allows the elimination of certain contaminants from preparations already enriched in factor VIII. The biological activity and criteria of purity of the factor VIII R : Ag preparation obtained are presented.

INTRODUCTION. — Depuis plusieurs années déjà l'étude physicochimique du facteur VIII est l'objet de nombreux travaux. Si la majorité d'entre-eux concordent en ce qui concerne son comportement en chromatographie de tamisage moléculaire, sa nature glycoprotéinique et sa masse moléculaire, les quelques résultats publiés sur la composition chimique de la molécule sont discordants ([1]-[6]).

Ces divergences peuvent être dues à la présence de contaminants car la pureté des préparations a été plus ou moins contrôlée par les auteurs. C'est pourquoi nous avons entrepris de préparer une petite quantité de facteur VIII très pur afin d'en étudier ensuite les principaux caractères physicochimiques et de les comparer aux résultats décrits jusqu'à présent. Comme on ignore encore si l'activité Willebrand (VIII : vWF) et l'activité coagulante du facteur VIII (VIII : C), cette dernière étant très labile, sont portées par une molécule unique, nous nous sommes attachés à purifier la molécule, appelée VIII R : Ag, d'identification facile car capable de précipiter avec les anticorps hétérologues. Dans ce but, les procédés classiques de préparation (précipitation, tamisage moléculaire) ont été complétés par une étape ultime de purification par chromatographie d'affinité sur immuno-absorbant.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Purification du facteur VIII.* — Dans une première étape, du glyocolle, à la concentration finale de 12%, est ajouté sous agitation, à température ambiante, à des cryoprécipités lyophilisés et remis en solution dans de l'eau distillée. Après 40 mn de centrifugation à $1\ 500 \times g$ et à $+18^\circ\text{C}$, le surnageant est recueilli et congelé à -80°C . Après décongélation lente de 36 h à $+4^\circ\text{C}$, la partie insoluble (fraction S-VIII) est récupérée par une centrifugation de 40 mn à $1\ 500 \times g$ et à 0°C .

Le précipité S-VIII, dissous dans un tampon imidazole 0,02 M/NaCl 0,14 M de pH 7,0 (IBS) est purifié par tamisage moléculaire sur une colonne (2,6 x 70 cm) de Biogel A-50 M (50-100 « mesh ») à température ambiante, en tampon IBS avec un débit de 30 ml/h (fractions de 5 ml). Les fractions recueillies à l'exclusion contiennent le facteur VIII (fraction V₀-VIII). La dernière étape de purification est réalisée grâce à l'immuno-absorption des contaminants par une chromatographie sur une colonne de 180 ml de « Sepharose 4-B » couplé par la méthode de Cuatrecasas [7] à 1,8 g d'immunoglobulines d'un sérum de Lapin immunisé avec toutes les protéines plasmatiques humaines, à l'exception du VIII R : Ag, dans les conditions opératoires décrites dans la figure 1. Ce sérum est préparé en injectant à un Lapin le plasma d'un malade atteint de maladie de Willebrand sévère (taux plasmatique de VIII R : Ag inférieur à $7,5 \cdot 10^{-3}$ U/ml) débarrassé de toute trace de VIII R : Ag par incubation préalable avec un sérum de Lapin monospécifique du facteur VIII humain.

Méthodes analytiques. — Les dosages de protéines ont été effectués par la méthode de Lowry [8]. L'activité coagulante du facteur VIII (VIII : C) a été mesurée selon la méthode en un temps de Soulier [9]. La détermination de l'antigène-facteur VIII (VIII R : Ag) a été réalisée par la technique immuno-enzymatique (E.L.I.S.A.) décrite précédemment [10] avec un antisérum (anti-VIII H) préparé au laboratoire par absorption, avec du surnageant de cryoprécipité, d'un sérum de Lapin immunisé contre la fraction V₀-VIII. Le cofacteur Willebrand (VIII : vWF) a été dosé semi-quantitativement en plaque de microtitration suivant la technique de Sultan et Rossi [11], avec des plaquettes humaines lavées et formolées selon le protocole préconisé par Zuzel [12].

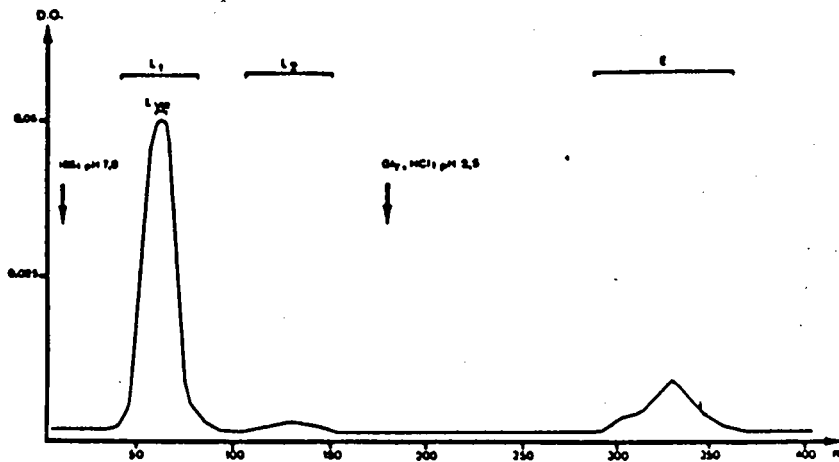


Fig. 1. — Chromatographie d'affinité de 15 ml de fraction V₀-VIII sur colonne (3 x 20 cm) d'immuno-absorbant. Absorption et lavage : tampon IBS; élution : tampon glycolle, HCl 0,1 M de pH 2,5; débit : 27 ml/h; volume des fractions : 4,5 ml. En abscisses : volumes recueillis; en ordonnées : absorbances à 278 mn.

Contrôles de pureté. — Les immunodiffusions qualitatives selon la technique d'Ouchterlony [12] ont été réalisées sur acétate de cellulose. Les immuno-électrophorèses bidimensionnelles, en milieu gélosé contenant de l'antisérum humain total (ASHT) ou de l'anti-VIII H, ont été effectuées selon la technique de Scheidegger [14] et les électro-immunodiffusions quantitatives selon la méthode de Laurell [15]. Les Lapins ont été immunisés suivant le protocole de Vaitukaitis [16]. Les sérums anti-fibrinogène et anti-CIG proviennent de la firme Behring Hoechst.

RÉSULTATS. — 1. A partir de 6 cryoprécipités lyophilisés, contenant au total 1 500 U de F VIII : C on obtient un précipité S-VIII qui, repris par 15 ml de tampon IBS, renferme 58 U de F VIII : C par millilitre. Le rendement en activité coagulante de cette première étape avoisine donc 62 p. 100.

2. La fraction S-VIII, après tamisage moléculaire fournit à l'exclusion un pic d'activité renfermant 500 U de F VIII : C.

3. Le profil obtenu par chromatographie sur immuno-absorbant des 3 fractions les plus riches en protéines (V₀-VIII) est précisé dans la figure 1. Par lavage à l'aide du tampon IBS on obtient une fraction majeure L₁ contenant 30 p. 100 des protéines injectées, suivie d'un pic mineur appelé L₂. L'élution de la colonne détache une fraction protéinique E.

4. Les résultats de l'analyse de la fraction obtenue au maximum du pic L₁ (L-VIII) et de la fraction E concentrée sur membrane Amicon UM-10 sont décrits dans le tableau et

dans les figures 2 à 4. La fraction L-VIII contient 58 µg de protéines et 7,5 U de F VIII R : Ag par millilitre. Cette activité correspond à un enrichissement de 10000 fois par rapport au plasma de départ et à un taux plasmatique de facteur VIII d'environ 8 mg/l. La fraction L-VIII a conservé une partie de son activité biologique (environ 2 U de VIII : vWF et de VIII : C). Elle réagit contre le sérum anti-VIII H mais ne donne aucun arc avec les antisérums

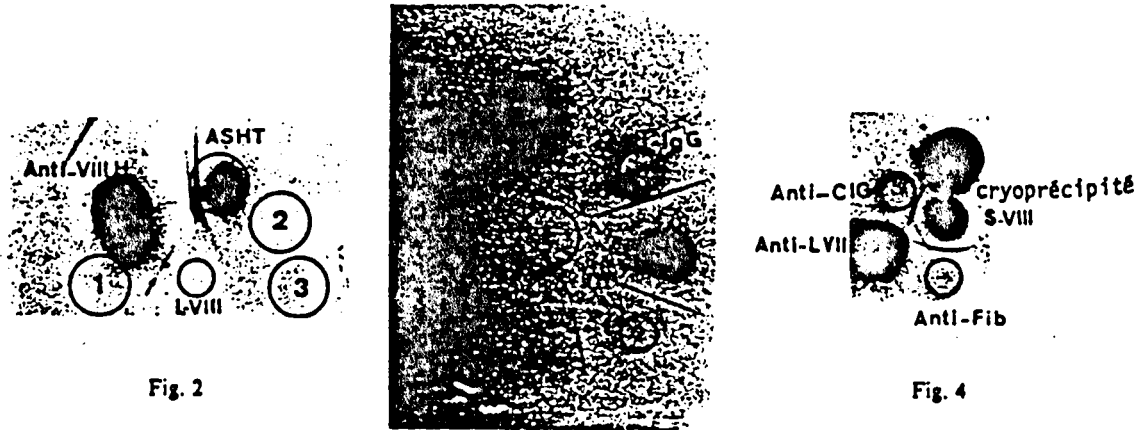


Fig. 2. — Étude immunologique de la fraction L-VIII. 1, anti-fibrinogène; 2, anti-CIG; 3, anti-immunoglobulines G (IgG).
 Fig. 3. — Étude immunologique de la fraction E concentrée. 1, anti-IgA; 2, anti-IgM; 3, anti-CIG; 4, anti-fibrinogène; 5, anti-β-lipoprotéine.
 Fig. 4. — Mise en évidence dans le sérum anti-L-VIII d'anticorps réagissant avec un antigène présent dans la fraction S-VIII, mais différent de la CIG et du fibrinogène.

monospécifiques suivants : anti-fibrinogène, anti-CIG (cold insoluble globuline) et anti-immunoglobulines G (IgG) (fig. 2). La fraction E, au même taux protéique, ne contient que des traces de VIII R : Ag, de l'ordre de $5 \cdot 10^{-3}$ U/ml, et ne possède aucune activité biologique liée au facteur VIII. Son étude immunologique réalisée après concentration à un taux de 200 µg/ml de protéines montre que, si elle ne donne aucun arc avec l'anti-VIII H, elle forme un arc de précipitation contre l'ASHT qui se raccorde à l'arc obtenu contre l'anti-IgG (fig. 3).

TABEAU

Dosage du facteur VIII dans l'effluent (fraction L-VIII à 58 µg/ml) et dans l'éluat (fraction E, dialysée et concentrée à 55 µg/ml) de chromatographie d'immuno-affinité

Fractions	F VIII R : Ag (U/ml)	F VIII : vWF (U/ml)	F VIII : C (U/ml)
L-VIII.....	7,5	2	1,7
E.....	0,005	< 0,015	< 0,005

5. Le sérum du Lapin immunisé avec la fraction L-VIII (anti-L-VIII) ne forme qu'un seul arc de précipitation contre une fraction enrichie en facteur VIII (S-VIII). Comme le montre la figure 4, cet arc donne une réaction de non-identité avec les antisérums anti-CIG

et anti-fibrinogène (anti-Fib). Ce sérum est monospécifique du facteur VIII comme l'illustre la figure 5 : il réagit avec un mélange de plasmas normaux purs ou dilués, mais ne donne aucun pic de précipitation avec du plasma de patient atteint de maladie de Willebrand sévère dépourvu de VIII R : Ag (fig. 5 A). De plus il ne nécessite aucune absorption préalable avec des protéines plasmatiques, contrairement au sérum de Lapin immunisé avec du V₀-VIII comme en témoigne la figure 5 B.

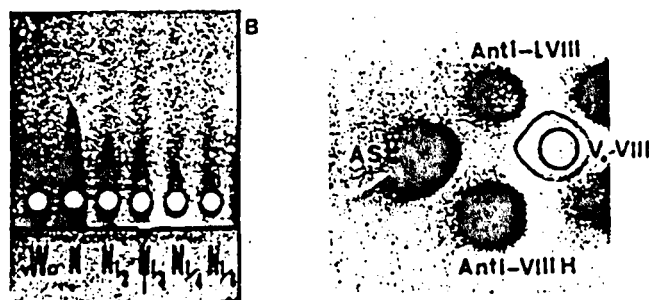


Fig. 5. — Mise en évidence de la monospécificité du sérum anti-L-VIII vis-à-vis du F VIII R : Ag. A, électro-immunodiffusion quantitative d'un mélange de plasma normal pur ou dilué (N) et d'un plasma de patient atteint de maladie de Willebrand sévère (vWd) dans une gélose contenant 0,5 p. 1 000 de sérum anti-L-VIII. B, immuno-diffusion qualitative des deux antisérums (anti-L-VIII et anti-VIII H) vis-à-vis d'une préparation purifiée de facteur VIII (V₀-VIII) et d'un ASHT.

CONCLUSIONS. — La chromatographie d'immuno-affinité permet d'éliminer de préparations enrichies en VIII R : Ag par cryoprécipitation et tamisage moléculaire, une fraction contaminante renfermant des IgG dont la présence peut influencer les résultats de l'analyse physicochimique du facteur VIII et pourrait expliquer les discordances constatées dans la littérature. Le facteur VIII R : Ag obtenu par cette technique conserve en partie son activité biologique. En outre, son étude immunologique et le fait qu'il induise la production d'anticorps monospécifiques chez le Lapin, révèlent un degré de pureté qui devrait nous permettre de mieux préciser ses propriétés physicochimiques.

(*) Remise le 9 avril 1979 et acceptée le 7 mai 1979.

- [1] E. J. HERSHGOLD, A. M. DAVISON et M. E. JANSZEN, *J. Lab. Clin. Med.*, 77, 1971, p. 185-205.
- [2] S. L. MARCHESI, N. R. SHULMAN et H. R. GRALNICK, *J. clin. Invest.*, 51, 1972, p. 2151-2161.
- [3] G. A. SHAPIRO, J. C. ANDERSEN, S. V. PIZZO et P. A. MCKEE, *J. clin. Invest.*, 52, 1973, p. 2198-2210.
- [4] M. E. LEGAZ, G. SCHMER, R. B. COUNTS et E. W. DAVIE, *J. Biol. Chem.*, 248, 1973, p. 3946-3955.
- [5] L. HOLMBERG, J. O. JEPSON, I. M. NILSSON et J. STENFLO, *Thromb. Res.*, 6, 1975, p. 523-532.
- [6] J. D. OLSON, W. J. BROCKWAY, D. N. FASS, E. J. BOWIE et K. G. MANN, *J. Lab. Clin. Med.*, 89, 1977, p. 1278-1294.
- [7] P. CUATRECASAS, *J. Biol. Chem.*, 245, 1970, p. 3059-3065.
- [8] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUCHT, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, p. 265.
- [9] J. P. SOULIER et M. J. LARRIEU, *Sang.*, 24, 1953, p. 205-215.
- [10] C. MAZURIER, A. PARQUET-GERNEZ et M. GOUEMAND, *Path. Biol.*, 25 Suppl., 1977, p. 18-24.
- [11] Y. SULTAN et J. ROSSI, *La Nouvelle Presse Médicale*, 6, 1977, p. 44-46.
- [12] M. ZUZEL, M. NILSSON et M. ÅBERG, *Thromb. Res.*, 12, 1978, p. 745-754.
- [13] Ö. OUCHTERLONY, *Progr. Allergy*, 5, 1958, p. 1.
- [14] J. J. SCHEIDEGGER, *Int. Arch. Allergy*, 7, 1955, p. 103.
- [15] C. B. LAURELL, *Analyt. Biochem.*, 15, 1966, p. 45.
- [16] J. VAITUKAITIS, J. B. ROBBINS, E. NIESCHLAG et G. T. ROSS, *J. Clin. Endocr.*, 33, 1971, p. 988-991.

C. M., A. P., B. S. et M. G. : Laboratoire d'Hémostase,
Centre régional de Transfusion sanguine, 21, rue Camille-Guérin, 59000 Lille;

J. M. : Laboratoire de Chimie biologique
et laboratoire associé au C.N.R.S., n° 217,
Université des Sciences et Techniques de Lille-I,
B.P. n° 36, 59650 Villeneuve d'Ascq.

Les résultats de cette technique de purification par chromatographie d'affinité montrent que nous obtenons une fraction contenant à la fois l'activité coagulante VIII:C, le VIII R:Ag et le VIII R:RCO. Le rendement de cette préparation est assez faible, de l'ordre de 7 % mais ce n'est pas là un écueil rédhibitoire, car il faut souligner que nous utilisons, pour ce type de recherche, les reliquats de fractions standards ou concentrées servant aux contrôles de chaque lot de notre production, les fractions non cédables car ne satisfaisant pas aux normes officielles, et du plasma, non utilisable pour la préparation de dérivés sanguins, provenant de plasmaphères thérapeutiques.

Ce type de préparation comporte un inconvénient supplémentaire : celui d'être assez long et de ne pas être adapté au traitement de plus de 2 à 3 litres de plasma de départ c'est-à-dire de n'aboutir qu'à des quantités de l'ordre de 2 mg en finale. Néanmoins, comme il fournit ce qu'on appelle maintenant le F VIII/vwf sous forme pure puisqu'après injection aux lapins il n'induit que des anticorps précipitants le VIII R:Ag, ce protocole de purification a été retenu pour les études ultérieures concernant la composition chimique et l'étude de la copule glycanique de cette molécule.

IV - COMPOSITION CHIMIQUE DU F VIII

Cet article fait état d'une étude de la composition chimique du complexe F VIII/vwf obtenu selon le protocole décrit précédemment. Après contrôle de leur pureté, différentes préparations obtenues par chromatographie d'affinité sont dialysées, lyophilisées, puis soumises à une extraction au chloroforme-méthanol afin d'éliminer et de quantifier leur fraction de nature lipidique. Le résidu obtenu est, soit soumis à une hydrolyse acide avant analyse des acides aminés, soit à une méthanolyse et analyse des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse après trifluoro-acétylation.

B.4. Factor VIII

CHEMICAL COMPOSITION OF FACTOR VIII

C. MAZURIER, B. SAMOR, A. PARQUET-GERNEZ,
B. FOURNET,* M. GOUEMAND and J. MONTREUIL*

*Laboratoire d'Hémostase, Centre Régional de Transfusion Sanguine,
21 rue C. Guérin, 59012, Lille, France*

**Laboratoire de Chimie Biologique et L.A. CNRS No 217, Université des Sciences et
Techniques de Lille 1, BP 36, Villeneuve d'Ascq, France*

ABSTRACT

Factor VIII purified from therapeutic concentrates by gel filtration and immuno-affinity chromatography is obtained in a form which induces monospecific antibodies in rabbits and in quantities permitting chemical characterization. Three preparations have been submitted to complete chemical analysis. A lipid content of about 20 per cent of dry weight was calculated after Folch's extraction. The carbohydrate content determined by gas-liquid chromatography was found to be 14.5 ± 2.5 per cent of glycoprotein. Since the carbohydrate portion seems to play a role in the biological function of factor VIII / von Willebrand factor, we have further investigated its monosaccharide molar composition and attempted to separate O - and N - glycosidically-linked carbohydrate chains in order to establish the structure of the glycans.

KEYWORDS

Factor VIII / von Willebrand factor - Affinity chromatography - Chemical composition - Carbohydrate -

INTRODUCTION

Human factor VIII / von Willebrand factor (F VIII/vWF) contains both coagulant activity (F VIII:C) and an activity required for normal platelet hemostatic function supported by a factor VIII-related antigen (F VIII:Ag) and measured by its ability to agglutinate normal human platelets in the presence of ristocetin (F VIII:RCo). The chemical composition of this complex is yet not precisely known and the results published (HERSGOLD and co-workers, 1971 ; LEGAZ and co-workers, 1973 ; MARCHESI and co-workers, 1972) have been obtained on preparations validated by insufficient criteria of purity. Immuno-chromatography in conditions previously published (MAZURIER and co-workers, 1979) provides us with a material inducing monospecific antibodies in rabbits, keeping in part its biological activities (procoagulant activity : F VIII:C and F VIII:RCo), and in sufficient amount for investigating the chemical composition of factor VIII.

FACTOR VIII

MATERIAL AND METHODS

Factor VIII Preparations

Factor VIII was purified as already described (MAZURIER and co-workers, 1979). In brief, therapeutic factor VIII concentrates from CRTS Lille were subjected to Biogel A-50 M gel filtration. The void volume fractions (VIII +) were purified by immuno-affinity chromatography on immunoglobulins from a rabbit immunized with the plasma of patient with von Willebrand disease (vWD) absolutely devoid of factor VIII:Ag. The fractions not bound to the insolubilized immunoglobulins (L-VIII) were assayed for protein and factor VIII-related activities. The L-VIII sample containing the highest protein concentration was kept for the study of purity. The remaining fractions L-VIII were pooled and freeze-dried for chemical analysis.

Analytical Methods

Biological analysis. F VIII : C was assayed by the one-stage method of SOULIER and LARRIEU (1953), F VIII R : Ag by an immuno-enzymatic method (MAZURIER and co-workers, 1977) and F VIII:RCo by the semi-quantitative technique of SULTAN and ROSSI (1977).

Chemical analysis. Protein concentrations were determined by the method of LOWRY and co-workers (1951). The lipid content was estimated on several preparations L-VIII by weighing the fraction extracted by the chloroform - methanol mixture devised by FOLCH and co-workers (1957). Amino-acid analyses were performed on a Beckman automatic amino-acid analyzer after acid hydrolysis under vacuum (5.6 N HCl, 24, 48, 72 hr, 105°C). After lipid extraction three L-VIII preparations were subjected to methanolysis, carbohydrate composition and molar ratios of monosaccharides were calculated on the basis of 3 mannose residues, after gas-liquid chromatography (ZANETTA and co-workers, 1972).

Alkaline borohydride treatment of factor VIII. The 8-elimination was performed according to AMINOFF and co-workers (1980). The liberated glycans were fractionated by ion exchange chromatography on Dowex AG 50 x 2 column with distilled water and a 50 mM pyridine-acetate, pH 5.4 buffer. Three fractions containing sugars were thus separated : W-1, W-2 eluted by water, and A by the buffer.

RESULTS AND DISCUSSION

Purification of Factor VIII

The fractions L-VIII, with a mean of 129.3 U of F VIII:Ag/mg were purified approximately 9000 fold from human plasma with an overall yield of about 7 p 100, a specific F VIII:RCo activity of 34.5 U/mg and F VIII:C activity of 29.3 U/mg. These preparations comply with all immunological and physical criteria of purity.

Analysis of Chemical Composition

The lipid content is, on average of four extractions, 20.5 p 100 of total weight of L-VIII freeze-dried preparations. Although this content is constant (Table I) we can not yet assert that lipids are not absorbed on the glycoproteic portion of factor VIII molecules. The results for the carbohydrate content of three different preparations are also summarized in Table I. The total carbohydrate content

CHEMICAL COMPOSITION OF FACTOR VIII

(14.55 p. 100) is in agreement with the recent result (15 p. 100) of SODFTZ and co-workers (1979). The amino-acids compositions on the basis of one alanine residue are reported in Table 2.

TABLE 1 Centesimal Composition of three L-VIII Preparations

L-VIII preparation	1	2	3	mean
Lipid content	20	20.0	23.0	21.0
Total carbohydrate content	12	17.2	14.5	14.5
Neutral monosaccharides	5.8	7.00	6.70	6.50
N-acetyl-hexosamines	3.6	5.30	3.85	4.25
N-acetyl-neuraminic acid	2.6	4.90	3.90	3.80

TABLE 2 Amino Acid Composition of three L-VIII Preparations



L-VIII preparation	1	2	3	mean
Asp	1.98	1.88	1.88	1.91
Thr	1.12	0.97	1.05	1.05
Ser	1.37	1.58	1.29	1.41
Glu	2.54	2.12	2.12	2.26
Pro	1.33	1.70	1.34	1.46
Gly	1.45	1.44	1.34	1.41
Ala	1.	1.	1.	1.
Cys/2	1.30	-	1.22	1.26
Val	1.24	1.08	1.21	1.18
Met	0.32	-	0.31	0.31
Ile	0.61	0.45	0.59	0.55
Leu	1.59	1.12	1.51	1.41
Tyr	0.57	0.53	0.51	0.54
Phe	0.64	0.53	0.59	0.59
Lys	0.78	0.72	0.81	0.77
His	0.52	0.38	0.49	0.46
Arg	0.95	0.79	0.93	0.89

Analysis of carbohydrate portion

Results summarized in Table 3 are in agreement with coexistence of N- and O-glycosidically linked glycans in factor VIII. Due to the centesimal and molar compositions and MW = 200 000, we can estimate that statistically each subunit possesses 8 glycans linked O-glycosidically on the protein by GalNAc residues and 8 glycans N-glycosidically-linked. Preliminary structural studies point to the fact that N-glycans are heterogeneous and consist essentially of bi-antennary structures. Carbohydrate analysis of the products of alkaline borohydride treatment (table 4) confirms this hypothesis and shows that GalNAc residues are

FACTOR VIII

all reduced : they are involved in the linkage with the peptidic chain. Moreover the existence of "megaloglycans" seems unlikely, so these results do not appear in agreement with the presence of A blood group oligosaccharide structures on human factor VIII/vWF reported by SODETZ and co-workers (1979).

TABLE 3 Monosaccharides Ratios of three L-VIII Preparations

L VIII preparation	1	2	3	Mean
Man	3.00	3.00	3.00	3.00
Gal	4.10	3.80	4.00	3.97
Fuc	1.20	1.13	1.30	1.21
GlcNAc	3.40	3.69	3.20	3.43
GalNAc	1.14	1.12	0.92	1.06
NeuAc	2.40	3.40	3.00	2.94

TABLE 4 Molar Ratios of Monosaccharides of the three Fractions obtained after β -Elimination.

Fraction	Man	Gal	Fuc	GlcNAc	NeuAc	GalNAc	GalNAc-ol
W - 1	3	5.80	1.15	4.15	7.30	0	1.95
W - 2	3	2.95	1.02	3.60	2.50	0	0
A	3	2.20	1.08	2.30	0.80	0	0

REFERENCES

- Aminoff, D., W. G. Gathmann, G. M. Mac Lean, and T. Yadomae (1980). Quantitation of oligosaccharides released by the β -elimination reaction. *Anal. Biochem.*, **101**, 44-53.
- Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley (1957). *J. Biol. Chem.*, **226**, 497.
- Hershgold, E. J., A. M. Davison, and M. E. Janszen (1971). Isolation and some chemical properties of human factor VIII. *J. Lab. Clin. Med.*, **77**, 185-205.
- Legaz, M. E., G. Schmer, R.B. Counts, and E. W. Davie (1973). Isolation and characterization of human factor VIII. *J. Biol. Chem.*, **248**, 3946-3955.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebroucht, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
- Marchesi, S. L., N. R. Shulman, and H. R. Gralnick (1972). Studies on the purification and characterization of human factor VIII. *J. Clin. Invest.*, **51**, 2151-2161.
- Mazurier, C., A. Parquet-Gernez, and M. Goudemand (1977). Dosage de l'antigène lié au facteur VIII par la technique ELISA. Intérêt dans l'étude de la maladie de Willebrand. *Path. Biol.*, **25** suppl, 18-24.
- Mazurier, C., A. Parquet-Gernez, B. Samor, M. Goudemand, and J. Montreuil (1979). Etude de l'antigène lié au facteur VIII. Purification par chromatographie d'immuno-affinité. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **288**, 1431-1434.
- Sodetz, J. M., J. C. Paulson, and P. A. Mc Kee (1979). Carbohydrate composition and identification of blood group A, B, and H oligosaccharide structures on human factor VIII/von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.*, **254**, 10754-10760.
- Soulier, J. P., and M. J. Larrieu (1953). Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des fractions antihémophiliques A et B. *Sang*, **205-215**.
- Sultan, Y., and J. Rossi (1977). Méthode de mesure de l'activité Willebrand sur plaque de microtitration. *Nou. Presse Med.*, **6**, 44-46.
- Zanetta, J. P., W. C. Brekenridge, and G. Vincendon (1972). Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methylglycosides as trifluoroacetate derivatives. Application to glycoproteins and glycolipids. *J. Chromatogr.*, **69**, 291-304.

Les résultats obtenus lors de l'étude de la composition chimique du F VIII/vWf peuvent être comparés à ceux obtenus jusqu'à présent:

En ce qui concerne les lipides, nous avons pu voir (p.31, 35) que notre taux est nettement plus élevé que ceux obtenus par différents auteurs. Nous pensons qu'il est très possible que nous ayons des chylomicros contaminant nos préparations car nous ne sélectionnons pas, étant donné le volume plasma de départ nécessité par notre type de préparation, les plasmas et n'éliminons pas ceux qui sont lipémiques. A l'heure actuelle, nous ne sommes pas encore attachés au problème de ces lipides, le fait qu'ils soient présents à un taux constant ne permet pas de dire qu'ils fassent partie intégrante de la molécule F VIII/vWf, car nos préparations ne sont pas obtenues à partir d'un seul plasma mais d'un mélange de plasmas d'au moins 10 donneurs différents.

En ce qui concerne les acides aminés, nous avons regroupé dans le tableau XIX (p.196) nos résultats exprimés sur la base du nombre de résidus pour 10000 g de protéines, mode d'expression généralement utilisé par les différents auteurs.

Les résultats obtenus sur la copule glycanique, qui a fait l'objet par la suite d'expérimentations plus précises, seront discutés ultérieurement à la suite de l'article consacré à l'étude préliminaire de cette copule.

TABLEAU XIX

COMPARAISON ENTRE LES RESULTATS DE LA LITTERATURE
ET NOS RESULTATS, CONCERNANT LA COMPOSITION EN
ACIDES AMINES DU F VIII/vWF HUMAIN, EXPRIMEE EN
NOMBRE DE RESIDUS POUR 100 000 G DE PROTEINE

	VALEURS OBTENUES PAR DIFFERENTS AUTEURS (P.32)		RESULTATS LILLE	
	Moyenne	Extrêmes	Moyenne	Extrêmes
Lys	46,2	39,9 à 50,8	38,6	36,1 à 40,7
His	21,9	17,3 à 27,2	23,1	19,1 à 26,1
Arg	42,3	35,8 à 48,2	44,7	39,7 à 47,7
Asp	82,9	69,8 à 103	95,9	94,3 à 99,4
Thr	50,8	49,5 à 60,1	52,7	48,7 à 56,2
Ser	73,8	63,0 à 87,7	70,8	64,8 à 79,3
Glu	104,8	89,9 à 114,9	113,5	106,4 à 127,5
Pro	59,5	52,1 à 66,0	72,8	66,8 à 85,3
Gly	73,1	62,9 à 86,9	70,8	67,3 à 72,8
Ala	50,2	43,8 à 54,3		50,2
½ Cys	53,9	23,5 à 65,7	63,2	61,2 à 65,3
Val	69,3	59,6 à 77,8	59,2	54,2 à 62,2
Met	12,9	8,4 à 25,1	15,8	15,6 à 16,1
Ile	32,5	31,2 à 34,5	27,6	22,6 à 30,6
Leu	64,4	48,8 à 72,2	70,6	56,2 à 79,8
Tyr	20,1	17,8 à 23,0	27,1	25,6 à 28,6
Phe	25,5	24,0 à 27,0	29,6	26,6 à 32,1

BU
LILLE

V -- RESULTATS PRELIMINAIRES SUR LA COPULE GLYCANNIQUE DU F VIII/

Ainsi que nous l'avons souligné (p.71 à 74) plusieurs éléments tendent à prouver que les glycanes du F VIII/vWf pourraient jouer un rôle dans son activité Willebrand. Ceci ajouté au fait que nous avons travaillé pendant plusieurs années dans le laboratoire du Prof. MONTREUIL, sous la direction du Prof. G. SPIK, qui est spécialisé dans l'étude des structures glycaniques, a motivé l'orientation préférentielle des recherches de type biochimique vers la copule glycanique du F VIII/vWf. Avant d'envisager les études, telles que celles présentées p.73 et 74, permettant de montrer, indirectement, le rôle des monosaccharides dans l'activité biologique du F VIII/vWf, nous avons choisi de préciser quelle est la nature des glycanes de ce complexe. Pour ce faire, nous avons soumis ce complexe à deux types de traitements différents :

- la β -élimination qui réduit et libère les glycanes liés O-glycosidiquement à la chaîne protéique par des résidus Serine et Threonine et coupe la protéine où restent attachés les glycanes liés N-glycosidiquement par l'intermédiaire d'Asparagine.
- l'hydrazinolyse qui libère les N-glycanes mais détruit les O-glycanes.

THROMBOSIS RESEARCH 25; 81-89, 1982
0049-3848/82/010081-09\$03.00/0 Printed in the USA.
Copyright (c) 1982 Pergamon Press Ltd. All rights reserved.

PRELIMINARY RESULTS ON THE CARBOHYDRATE MOIETY
OF FACTOR VIII/VON WILLEBRAND FACTOR (FVIII/vwf)

B. SAMOR, C. MAZURIER and M. GOUDEMAND.

Laboratoire d'Hémostase, Centre Régional de Transfusion Sanguine, 21, Rue C.
Guérin, 59012 LILLE, FRANCE

P. DEBEIRE, B. FOURNET and J. MONTREUIL.

Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217,
Université des Sciences et Techniques de Lille I, 59655 VILLENEUVE D'ASCQ
Cédex, FRANCE

(Received 27.4.1981; in revised form 25.11.1981.
Accepted by Editor D. Meyer)

ABSTRACT

Human FVIII/vwf, purified 9 000 fold, was prepared from therapeutic concentrates by gel filtration and by immuno-affinity chromatography on insolubilized immunoglobulins isolated from a rabbit immunized with the plasma of a patient devoid of FVIII R:Ag. These preparations which contain coagulant activity and agglutinate normal washed human platelets in the presence of ristocetin are immunologically pure. The carbohydrate moiety of this highly purified FVIII/vwf was submitted to analysis by gas liquid chromatography and thin layer chromatography before and after hydrazinolysis and alkaline-borohydride treatment. The total carbohydrate content is 14.4 p. cent (w/w). Man and GalNAc residues were identified, this result indicating the co-existence of N- and O-glycosidically linked glycans (70 and 30 p. cent respectively). After hydrazinolysis it was demonstrated that the N-glycosidically linked glycans do not contain GalNAc residues. One major glycan belonging to the N-acetyllactosaminic type with a bi-antennary structure has been characterized by thin layer chromatography. The alkaline-borohydride treatment procedure reduced all the FVIII/vwf GalNAc to GalNAc-ol residues, demonstrating that they are all involved in the linkage of the O-glycans with the peptide chain and consequently they cannot be in oligosaccharidic sequences inducing A-blood group activity. Furthermore, at least 10 O-glycosidically linked glycans were identified by thin layer chromatography. Thus, the high degree of heterogeneity of the FVIII/vwf carbohydrate moiety requires further structural studies in order to precise which class of glycans is involved in the biological activity of FVIII/vwf.

Key words : Factor VIII/vwf - Carbohydrates - Glycans -

INTRODUCTION

Human factor VIII/von Willebrand factor (FVIII/vWf) is a complex containing a coagulant activity (FVIII:C) and an activity required for normal platelet hemostatic function which is carried by a factor VIII-related antigen (FVIII R:Ag) and measured by its ability to agglutinate normal washed human platelets in the presence of ristocetin (FVIII R:RCo). Recent studies suggest that the carbohydrate moiety of FVIII/vWf is important for the binding of FVIII/vWf to platelets in presence of ristocetin and for the in vivo survival of the protein (1-6). Moreover, blood group A, B and H activities have been recently characterized on human FVIII/vWf (7). However, the carbohydrate composition of FVIII/vWf is not yet precisely known and the results published (8-10) have been obtained from preparations with different degrees of purity.

The aim of this paper was to establish more precisely the monosaccharide composition of a preparation of highly purified FVIII/vWf and to determine the nature of its carbohydrate chains.



MATERIALS AND METHODS

Preparation and purification of factor VIII/vWf. Factor VIII/vWf was purified from therapeutic concentrates according to a procedure previously described (11) : after gel filtration of factor VIII concentrates (1 500 FVIII:C units) on a Biogel A-50M column (2.6 x 80 cm), the void volume fractions were further purified by immuno-affinity chromatography on a column of immunoglobulins-Sepharose (2.6 x 30 cm). The immunoglobulins were obtained from the serum of a rabbit immunized with the plasma of a patient with severe von Willebrand's disease, devoid of Factor VIII/vWf (VIII R:Ag < 0.003 U/ml). The fractions not bound to the insolubilized immunoglobulins, called L-VIII, were submitted to immunological analysis and after delipidation according to Folch *et al.* (12) to chemical analysis.

Carbohydrate determinations. The centesimal carbohydrate composition, identification and molar ratio of monosaccharides of the intact glycoprotein and of its products of hydrazinolysis and 3-elimination were determined by gas-liquid chromatography (g.l.c.) after methanolysis and trifluoroacetylation using the technique described by Zanatta *et al.* (13).

Treatment with alkaline-borohydride was performed on delipidated L-VIII preparations as described by Aminoff *et al.* (14) with some minor modifications. The reaction was stopped by placing the solution in an ice bath and adding Dowex 50 x 8 (25-50 mesh, H⁺ form) until pH 4.5 was reached. The mixture of reduced oligosaccharides and glycopeptides with N-linked glycans, which are stable in the conditions of 3-elimination, was desalted by gel filtration on a Biogel P-2 column.

Hydrazinolysis. A lyophilized and delipidated L-VIII preparation was hydrazinolysed according to Bayard *et al.* (15) : the sample (30 mg) was dried in vacuum over P₂O₅ and then heated in a glass sealed tube with 300 µl anhydrous hydrazine for 20 h at 105° C. The excess of hydrazine was evaporated under nitrogen. The evaporation was repeated twice after addition of a few drops of toluene. The residual hydrazine was eliminated in vacuum over H₂SO₄. This procedure specifically liberates N-deacetylated glycans N-glycosidically linked and destroys O-linked glycans (16). The glycans were further desalted as above and re-N-acetylated according to Reading *et al.* (17).

Thin layer chromatography (t.l.c.). Oligosaccharides were chromatographed overnight on silica thin-layer plates (HPTLC Silicagel 60) with solvent : pyridine/ethanol/acetic acid/n-butanol/water (10 : 100 : 3 : 10 : 30 by volume. In this solvent system, the glycopeptides do not migrate (18).

Other methods. FVIII coagulant activity was measured by a one-stage method (19), FVIII R:Ag by an immunoenzymatic assay (20) and FVIII R:RCo by a micro-titration technique (21). The protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. (22).

Standards (purified N- and O- glycosidically linked glycans). The mixture of N-glycosidically linked glycans A (disialylated) and B (monosialylated) was prepared from human serum transferrin by hydrazinolysis and their structures were determined (23) as follows : Glycan A : 1 NeuAc α 2 — 6 Gal β 1 — 4 GlcNAc β 1 — 2 Man α 1 — 6 (NeuAc α 2 — 6 Gal β 1 — 4 GlcNAc β 1 — 2 Man α 1 — 3) Man β 1 — 4 GlcNAc β 1 — 4 GlcNAc ; Glycan B : NeuAc α 2 — 6 Gal β 1 — 4 GlcNAc β 1 — 2 Man α 1 — 6 or 3 (Gal β 1 — 4 GlcNAc β 1 — 2 Man α 1 — 3 or 6) Man β 1 — 4 GlcNAc β 1 — 4 GlcNAc.

RESULTS

L-VIII fractions, with a mean of 129 U FVIII R:Ag/mg, were purified approximately 9 000 fold from human plasma with an overall yield of about 7 p. cent. Their specific FVIII:C and FVIII R:RCo activities were 29.3 and 34.5 U/mg respectively. These preparations gave no precipitation line against different antisera (anti-fibrinogen, - fibronectin, - immunoglobulins, - β -lipoproteins) and furthermore they induced in rabbits monospecific antibodies against FVIII/vWF.

The lipid content (21.5 ± 1.5 p. cent) was estimated on four lyophilized L-VIII preparations by weighing the fractions extracted by the chloroform-methanol mixture. Although this amount was reproducible from one experiment to the other, we cannot yet assert that these lipids are not adsorbed on the glycoprotein. These lipidic fractions were submitted to analysis by g.l.c. and as no sugar could be detected, the results below are related to the whole carbohydrate moiety of the glycoprotein.

The carbohydrate centesimal composition of FVIII/vWF (Table I) was determined on four lyophilized and delipidated L-VIII preparations. The application of g.l.c. to the study of the whole FVIII/vWF glycoprotein indicates a large amount of sugars (mean 14.4 p. cent) and NeuAc (mean 3.9 p. cent).

TABLE I

Centesimal Composition of Delipidated FVIII/vwf.

L-VIII preparations	1	2	3	4	Mean
Total carbohydrate content	12	17.2	14.5	13.8	14.4
Neutral monosaccharides	5.8	7	6.7	5.75	6.32
N-acetylhexosamines	3.6	5.3	3.85	3.87	4.16
N-acetylneuraminic acid	2.6	4.9	3.9	4.2	3.9

Identification and molar ratios determination of monosaccharides were performed as described in "Materials and Methods" and the results are summarized in Table II. The monosaccharides were identified as mannose (Man), galactose (Gal), fucose (Fuc), N-acetylglucosamine (GlcNAc), N-acetylgalactosamine (GalNAc), N-acetylneuraminic acid (NeuAc) and molar ratios were calculated on the basis of 3 Man residues which make up the inner-core of N-glycosidically linked glycans containing GlcNAc residues (24).

TABLE II
Monosaccharide Molar Ratios of FVIII/vWf Glycans

L-VIII preparations	1	2	3	4	Mean
Mannose	3	3	3	3	3
Galactose	4.1	3.8	4	3.4	3.83
Fucose	1.2	1.13	1.3	1.06	1.17
N-acetylglucosamine	4.4	4.69	4.2	4.56	4.46
N-acetylgalactosamine	1.14	1.12	0.92	0.84	1
N-acetylneuraminic acid	2.4	3.4	3	3.43	3.06

The simultaneous presence of Man, which is rarely identified in O-glycosidically linked glycans, and of GalNAc, a common marker of many oligosaccharides O-glycosidically linked to peptide chains (25), indicates that FVIII/vWf probably contains both N- and O-glycans. It is in order to verify this hypothesis that the purified FVIII/vWf preparations were further subjected to alkaline-borohydride treatment and hydrazinolysis (Table III).

TABLE III
Comparison between Monosaccharide Molar Ratios of Native FVIII/vWf (intact glycoprotein with both N- and O-glycans) (A), FVIII/vWf submitted to alkaline-borohydride treatment (reduced O-glycans and N-glycopeptides) (B), and FVIII/vWf hydrazinolysate (N-glycans) (C).

	A	B	C
Mannose	3	3	3
Galactose	3.83	3.8	2.4
Fucose	1.17	1.19	1.4
N-acetylglucosamine	4.46	4.2	4.2
N-acetylgalactosamine	1	0	0
N-acetylgalactosaminitol	0	0.99	0
N-acetylneuraminic acid	3.06	3.6	1.3

Table III-B shows the monosaccharide molar ratio of the products of β -elimination of FVIII/vWf. This ratio is identical to those obtained from the intact FVIII/vWf molecule (Table III-A). In fact, during the alkaline-borohydride treatment, the N-glycans, stable in reductive conditions, remained bound to peptidic chains, whereas the O-glycosidically linked glycans were released and reduced. The GalNAc residues were quantitatively reduced into N-acetylgalactosaminitol (GalNAc-ol) residues, so we can affirm that they are all involved in the linkage to serine or threonine residues and that they do not belong to N-glycosidically linked glycans. Furthermore, the t.l.c. of the products of β -elimination indicates a high degree of heterogeneity of the O-glycans (Fig. 1) : at least 10 migrating reduced oligosaccharides are characterized while the N-glycopeptides do not migrate in the solvent system used.



FIG. 1

Thin layer chromatography of FVIII/vWf O-glycosidically linked glycans released by alkaline-borohydride treatment (FVIII/vWf) and of the standard (S) : glycan C.

The monosaccharide molar ratio of FVIII/vWf submitted to hydrazinolysis is reported in Table III-C. As expected the Man, Fuc, GlcNAc molar ratio was similar to those of intact FVIII/vWf and no GalNAc residues could be detected. This result confirms that FVIII/vWf N-glycans do not contain GalNAc residues. This monosaccharide molar ratio of FVIII/vWf hydrazinolysate (Table III-C) is in agreement with the existence of a glycan of the N-acetyllactosaminic type with a monosialylated bi-antennary structure and one additional Fuc residue (theoretical monosaccharide molar ratio : Man : 3, Gal : 2, Fuc : 1, GlcNAc : 4, NeuAc : 1) (24). The t.l.c. of FVIII/vWf hydrazinolysate also gives evidence for a major component which migrates like the standard B (Fig.2).

On the basis of the FVIII/vWf centesimal composition (Table I), the monosaccharide molar ratios (Table II) and the molecular weight of the major N-glycosidically linked glycan characterized after hydrazinolysis (Table III-C) we can estimate that the N-glycans represent about 70 p. cent of the carbohydrate moiety of FVIII/vWf.

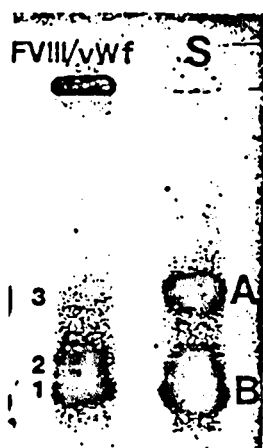


FIG. 2

Thin layer chromatography of FVIII/vWf N-glycosidically linked glycans released by hydrazinolysis (FVIII/vWf) and of the standards (S) : glycans A and B.

The results of hydrazinolysis (Table III-C) showing the presence of 3 Man residues in the major FVIII/vWf N-glycan, those of β -elimination demonstrating the existence of only 1 GalNAc-ol residue per reduced O-glycan (Table III-B) and the molar ratio Man : GalNAc (3:1) obtained with the intact glycoprotein (Table III-A) allow the assumption that O- and N-glycans of FVIII/vWf are in an equimolar ratio.

DISCUSSION

The method used to purify human FVIII/vWf in non-denaturing conditions provided sufficient amounts for chemical analysis. This preparation induced, like the Factor VIII obtained by heparin-Sepharose chromatography (26), monospecific antibodies in rabbits and has the advantage of keeping in part its biological activities (FVIII R:RCo and FVIII:C).

The lipid percentage of this preparation was higher than those previously published (8,27). This amount was reproducible from one preparation to the other and may be due to an adsorption of lipids onto FVIII/vWf molecules consecutive to our starting material and/or our purification method. However, since this lipidic fraction, which was easily eliminated from FVIII/vWf glycoprotein, contains no detectable sugar, our analysis is related to the whole carbohydrate moiety of FVIII/vWf.

This report indicates that FVIII/vWf contains a total carbohydrate content (14.4 p. cent) higher than those of most previous studies (8 - 10) but in agreement with the recent report of Sodetz *et al.* (7). Moreover we confirm the respective ratios of neutral sugars, N-acetylhexosamines, N-acetylneuraminic acid and N-acetylgalactosamine obtained by the latter authors (7).

Previous publications have noticed the simultaneous presence of Man and GalNAc residues in FVIII/vWf which suggests the presence of O- and N-glycosidically linked glycans (5, 7, 9, 28). Our results clearly demonstrate the co-existence of 30 p. cent of O- and 70 p. cent of N-glycosidically linked glycans. Furthermore, by t.l.c., we have given evidence of the high degree of heterogeneity of these glycans : at least 10 O-linked oligosaccharides and 3 N-linked glycans are separated.

The molar ratio of the products of hydrazinolysis indicates the

destruction of O-linked glycans and suggests the existence of a major N-linked glycan of the N-acetyllactosaminic type probably having a monosialylated bi-antennary structure. These findings are confirmed by t.l.c. analysis.

At last, some data are in contradiction with the findings of Sodetz *et al.* (7) who reported that FVIII/vWf oligosaccharides inducing blood group A activity may belong to glycans with alkaline-stable linkage. First, after alkaline-borohydride treatment, all the GalNAc residues are reduced so they are all involved in the linkage of the O-linked glycans with the protein and consequently cannot support the A-blood group activity which requires non-reducing terminal GalNAc residues. Secondly, as it was demonstrated by the analysis of the products of FVIII/vWf hydrazinolysis, the N-glycosidically linked glycans, with alkaline-stable linkage, do not contain any GalNAc residues. In conclusion, none of these glycans possesses oligosaccharidic sequences able to induce A-blood group activity. These results and others experiments (29) suggest that the blood group activity of FVIII/vWf molecules is not related to their own glycans but is probably due to a minor contamination by a glycolipidic or glycoprotein blood component.

In account of the high degree of heterogeneity of the carbohydrate moiety of FVIII/vWf, further structural studies will require fractionation followed by methylation, enzymatic analysis, nuclear magnetic resonance and mass spectrometry studies of glycans. The results may be fruitful to ascertain the type of oligosaccharides implicated in the biological activities of this complex molecule.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Mr Y. LEROY, C.N.R.S. technician, for his skilful technical assistance.

This study was supported by a grant of DGRST 81 L 0433.

REFERENCES

1. FUKUI, H. Some biological aspects of von Willebrand factor. Proc. XIth Cong. W.F.H., 71-79, 1976
2. GRALNICK, H.R. Factor VIII/von Willebrand factor protein. Galactose, a cryptic determinant of von Willebrand factor activity. J. Clin. Invest., 62, 496-499, 1978
3. MORISATO, D.K. and GRALNICK H.R. Selective binding of factor VIII/vWf to human platelets. Blood, 55, 9-15, 1980
4. SODETZ, J.M., PIZZO, S.V. and MCKEE, P.A. Relationship of sialic acid to function and in vivo survival of human factor VIII/von Willebrand factor protein. J. Biol. Chem., 252, 5538-5546, 1977
5. SODETZ, J.M., PAULSON, J.C., PIZZO, S.V. and MCKEE, P.A. Carbohydrate on human factor VIII/von Willebrand factor. Impairment of function by removal of specific galactose residues. J. Biol. Chem., 253, 7202-7206, 1978

6. KAO, K.J., PIZZO, S.V., McKEE, P.A. Factor VIII/von Willebrand protein. Modification of its carbohydrate causes reduced binding to platelets. J. Biol. Chem., 255, 10134-10139, 1980
7. SODETZ, J.M., PAULSON, J.C. and McKEE, P.A. Carbohydrate composition and identification of blood group A, B and H oligosaccharide structures on human factor VIII/von Willebrand factor. J. Biol. Chem., 254, 10754-10760, 1979
8. HERSHGOLD, E.J., DAVINSON, A.M. and JANSZEN, M.E. Isolation and some chemical properties of human factor VIII (antihemophilic factor). J. Lab. Clin. Med., 77, 185-205, 1971
9. MARCHESI, S.L., SHULMAN, N.R. and GRALNICK, H.R. Studies on the purification and characterization of human factor VIII. J. Clin. Invest., 51, 2151-2161, 1972
10. LEGAZ, M.E., SCHMER, G., COUNTS, R.B. and DAVIE, E.W. Isolation and characterization of human factor VIII (antihemophilic factor). J. Biol. Chem., 248, 3946-3955, 1973
11. MAZURIER, C., PARQUET-GERNEZ, A., SAMOR, B., GOUEMAND, M. and MONTREUIL, J. Etude de l'antigène lié au facteur VIII (FVIII R:Ag). Purification par chromatographie d'immuno-affinité. C.R. Acad. Sc. Paris, 288, 1431-1434, 1979
12. FOLCH, J., LEES, M. and SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226, 497-509, 1957
13. ZANETTA, J.P., BREKENRIDGE, W.C. and VINCENDON, G. Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methylglycosides as trifluoroacetate derivatives. Application to glycoproteins and glycolipids. J. Chromatogr., 69, 291-304, 1972
14. AMINOFF, D., GATHMANN, W.D., McLEAN, C.M., YADOMAE, T. Quantitation of oligosaccharides released by the β -elimination reaction. Anal. Biochem., 101, 44-53, 1980
15. BAYARD, B. and MONTREUIL, J. Actes du Colloque International N° 221 du C.N.R.S. sur les Glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, Editions du C.N.R.S., Paris, 209-218, 1974
16. KROTKIEWSKI, H. and LISOWSKA, E. Alkali-stable oligosaccharides isolated by hydrazinolysis of M and N blood group glycoproteins. Arch. Immunol. Ther. Exp., 26, 139-144, 1978
17. READING, C.L., PENHOET, E. and BALLOU, C. Carbohydrate structure of vesicular stomatitis virus glycoprotein. J. Biol. Chem., 253, 5600-5612, 1978
18. BAYARD, B., KERCKAERT, J.P., ROUX, D. and STRECKER, G. Hydrazinolysis of rat α -foetoprotein variants. In : Protides of Biological Fluids. H. Peeters (Ed.) Pergamon Press, 1979, pp. 153-156
19. SOULIER, J.P. and LARRIEU, M.J. Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des fractions antihémophiliques A et B. Sang, 205-215, 1953

20. MAZURIER, C., PARQUET-GERNEZ, A. and GOUEMAND, M. Dosage de l'antigène lié au facteur VIII par la technique ELISA. Intérêt dans l'étude de la maladie de Willebrand. Path. Biol., 25 suppl., 18-24, 1977
21. SULTAN, Y. and ROSSI, J. Méthode de mesure de l'activité Willebrand sur plaque de microtitration. Nouv. Presse Med., 6, 44-46, 1977
22. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951
23. SPIK, G., BAYARD, B., FOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S. and MONTREUIL, J. Studies on glycoconjugates. LXIV. Complete structure of two carbohydrate units of human serotransferrin. FEBS Lett., 50, 296-299, 1975
24. MONTREUIL, J., Recent data on the structure of the carbohydrate moiety of glycoproteins. Metabolic and biological implication. Pure and Appl. Chem., 42, 431-477, 1975
25. MONTREUIL, J., Primary structure of glycoprotein glycans. Basis for the molecular biology of glycoproteins. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 37, 157-223, 1980
26. MADARA, F., BELL, W.R. and CASTALDI, P.A. Isolation and insolubilisation of human factor VIII by affinity chromatography. Haemostasis, 7, 321-329,
27. OLSON, J.D., BROCKWAY, W.J., FASS, D.N., BOWIE, E.J.W., MANN, K.G. Purification of porcine and human ristocetin-Willebrand factor. J. Lab. Clin. Med., 89, 1278-1294, 1977
28. MAZURIER, C., SAMOR, B., PARQUET-GERNEZ, A., FOURNET, B., GOUEMAND, M., and MONTREUIL, J. Chemical composition of factor VIII. In : Protides of Biological Fluids. H. Peeters (Ed.) Pergamon Press, 1980, pp. 229-302
29. MAZURIER, C., SAMOR, B., MANNESSIER, L., PARQUET-GERNEZ, A. and GOUEMAND M. Blood group A and B activity associated with Factor VIII/von Willebrand factor. Blood Transf. Immunohematol., 24, 289-297, 1981

Les conclusions de cette étude, déjà avancées en partie dans l'article précédent, sont les suivantes:

- la partie glycoprotéinique du F VIII:vWf comporte environ 14,5 p.100 de monosaccharides, ce résultat est en accord avec SODETZ et Mc KEE (706) et vient d'être pris comme base de calcul par GRALNICK (707). Il est bien différent de ceux avancés avant 1979 (voir tableau VI p.32) ;

- la présence simultanée de N-Acetyl Glucosamine et N-Acetyl Galactosamine, mise en évidence également par SODETZ et al. (708) est en faveur de la coexistence de glycannes liés N- et O- glycosidiquement à la protéine. L'ensemble de nos résultats confirme ce fait et permet de préciser que chaque sous-unité du F VIII/vWf comporte certainement le même nombre (\approx 8) de chaînes N-glycanniques et de chaînons liés O-glycosidiquement.


- les compositions centésimales en monosaccharides que nous avons déterminé sont comparées dans les tableaux XX et XXI (p.208 et 209) à celles trouvées par les autres auteurs. Il est à noter que les résultats que nous avons obtenu par chromatographie en phase gazeuse ont été confirmés, par les techniques de dosage colorimétriques, à partir d'une préparation de 10 mg. Néanmoins, ce procédé n'a plus été utilisé par la suite car il nécessite de trop grandes quantités de matériel de départ.

TABLEAU XX
COMPOSITION CENTESIMALE, EXPRIMEE EN P.100 DE PROTEINE, EN MONOSACCHARIDES NEUTRES ET EN OSAMINES DU F VIII/vwf HUMAIN

MONOSACCHARIDES	REFERENCES	TECHNIQUE DE LIBERATION ET DE DOSAGE	RESULTAT
MONOSACCHARIDES NEUTRES	SODETZ <u>et al.</u> , (709)	hydrolyse acide; dosage enzymatique	2,43 ± 0,23
	KAO <u>et al.</u> , (710)	hydrolyse acide; dosage enzymatique	2,97 ± 0,27
	MORISATO <u>et</u> GRALNICK (711)	hydrolyse enzy-; dosage enzymatique	3,11 ± 0,19
	GRALNICK <u>et al.</u> , (712)	hydrolyse acide; dosage enzymatique	2,97 ± 0,32
	Moyenne des résultats LILLE	méthanolyse ; phase gazeuse	3,57
Man	SODETZ <u>et al.</u> , (709')	hydrolyse acide; dosage enzymatique ou colorimétrique	3,15 ± 0,45
	Moyenne des résultats LILLE	méthanolyse ; phase gazeuse	2,80
Fuc	SODETZ <u>et al.</u> , (709')	hydrolyse acide; dosage colorimétrique	0,97 ± 0,10
	GRALNICK <u>et al.</u> , (712)	hydrolyse acide; dosage colorimétrique	0,89
	Moyenne des résultats LILLE	méthanolyse ; phase gazeuse	0,99
Gal+Man+Fuc	Moyenne des résultats LILLE	hydrolyse acide; dosage colorimétrique	6,89
OSAMINES	MARCHESI <u>et al.</u> , (713)	hydrolyse acide; échange d'ions	2,7
	SODETZ <u>et al.</u> , (709')	hydrolyse acide; échange d'ions	4,00 ± 0,40
	GRALNICK <u>et al.</u> , (712)	hydrolyse enzy-; colorimétrique	3,60 ± 0,66
	Moyenne des résultats LILLE	méthanolyse ; phase gazeuse	3,97
Gal NAc	MARCHESI <u>et al.</u> , (713)	hydrolyse acide; échange d'ions	0,17
	SODETZ <u>et al.</u> , (709')	hydrolyse acide; échange d'ions	0,73 ± 0,09
	Moyenne des résultats LILLE	méthanolyse ; phase gazeuse	0,89
Glc NAc+Gal NAc	Moyenne des résultats LILLE	hydrolyse acide; dosage par colorimétrie	4,97



TABLEAU XXI
COMPOSITION CENTESIMALE, EXPRIMEE EN P.100 DE PROTEINE,
EN ACIDE SIALIQUE DU F VIII/vwf HUMAIN

REFERENCES	TECHNIQUES DE LIBERATION ET DE DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE	RESULTAT
LEGAZ <u>et al.</u> (714)	hydrolyse acide,*	0,9 à 1,2
GRALNICK <u>et al.</u> (715)	hydrolyse acide,*	1,18 ± 0,24
SODETZ <u>et al.</u> (716)	hydrolyse acide,*	4,74 ± 0,46
	hydrolyse enzymatique,*	4,93 ± 0,46
GRALNICK <u>et al.</u> (717)	hydrolyse acide,*	3,32 ± 0,23
	hydrolyse enzymatique,*	3,47 ± 0,32
SODETZ <u>et al.</u> (718)	hydrolyse acide,*	3,7 ± 0,32
	hydrolyse enzymatique,*	3,51
ROSENFELD et KIRBY (719)	hydrolyse acide et enzymatique,*	4,00
 KAO <u>et al.</u> (720)	hydrolyse acide,*	3,55 ± 0,43
MORISATO et GRALNICK (721)	non précisée,*	3,38 ± 0,28
DE MARCO et SHAPIRO (722)	hydrolyse acide,*	4,03 ± 0,49
GRALNICK <u>et al.</u> (723)	hydrolyse acide,*	4,47 ± 0,43
GRALNICK <u>et al.</u> (724)	hydrolyse acide,*	5,08
	hydrolyse enzymatique,*	4,68 à 5,02
MOYENNE DES RESULTATS-LILLE	hydrolyse acide, phase gazeuse	4,56
	hydrolyse acide, colorimétrique*	6,19

(* dosages par la technique à l'acide thiobarbiturique de WARREN : 724')

VI — ACTIVITE DE GROUPE A ET B ASSOCIEE AU FACTEUR VIII/FAC-
TEUR WILLEBRAND

Cet article fait suite à une publication de SODETZ et al. (725) qui font état de l'existence de structures oligosaccharides, caractéristiques de celles supportant les activités de groupe A, B, O, dans la molécule F VIII/vwf. Cette conclusion étant en désaccord avec nos résultats tendant à montrer que tous les résidus de N-Acetyl Galactosamine de cette molécule sont impliqués dans la liaison avec la protéine car ils sont réduits, lors du traitement par le borohydrure de K en milieu alcalin, au cours de la β -élimination (voir articles, p.194 et 201); nous avons d'abord recherché si nos préparations de F VIII/vwf, comme celles de SODETZ et al., présentaient une activité de groupe A,B/O. Ensuite, nous avons mis en évidence la relation entre le groupe A,B/O du sang à l'origine de la préparation du F VIII/vwf et l'activité de groupe de cette préparation. Enfin, en montrant la possibilité de contaminer le F VIII/vwf par des substances support d'activité A,B/O, nous avons avancé une hypothèse, toute autre que celle de SODETZ et al. (725), concernant l'origine de l'activité de groupe des préparations de F VIII/vwf.

Blood Transfusion and Immunohaematology
Tome XXIV. — N° 3. — 1981

Blood group A and B activity associated with factor VIII - von Willebrand factor

by C. MAZURIER, B. SAMOR, L. MANNESSIER,
A. PARQUET-GERNEZ and M. GOUDEMANT

Laboratoires d'Hémostase et d'Immuno-Hématologie,
Centre Régional de Transfusion Sanguine, LILLE.

INTRODUCTION

HUMAN factor VIII/von Willebrand factor (F VIII/vWf) isolated from plasma is associated with both procoagulant activity (F VIII:C) and an activity required for normal platelet hemostatic function (F VIII:vWf) carried by a factor VIII related antigen (F VIII R:Ag). This hemostatic function is related to the ability of factor VIII R:Ag to agglutinate normal human platelets in the presence of Ristocetin (VIII R:RCo). The carbohydrate portion of F VIII/vWf plays a role in its binding to platelets and their agglutination in presence of Ristocetin, and in its hepatic clearance [1-6]. Recently SODETZ *et al.* [7] have stated that oligosaccharide structures characteristic of blood group A, B/O are covalently linked to the F VIII/vWf molecule. This conclusion is founded on their observation that F VIII/vWf purified from pooled plasma possesses A, B and H blood group activities. It does not seem to be in agreement with one of our preliminary results relating to the chemical analysis of the carbohydrate portion of this molecule [8]. We have thus further studied the blood group activities of different preparations

Received : 3 February 1981.
Accepted : 17 April 1981.

MAZURIER C. and coll.

of F VIII/vWf isolated from either pooled or individual plasmas, and the glycans released from F VIII/vWf by different chemical treatments in order to elucidate these contradictory results.

MATERIALS AND METHODS

Factor VIII/vWf preparations

Factor VIII/vWf was purified as previously described [9] from therapeutic antihemophilic A (AHA) concentrates prepared from pooled plasmas by the C.R.T.S. Lille or from individual plasmas obtained in large amounts during therapeutic plasmapheresis. The void volume fractions (VIII +) obtained after gel filtration on Biogel A 50 M were either directly analysed or further purified by immunoaffinity chromatography on immunoglobulins from a rabbit immunized with the plasma of a severe vWd patient (absolutely devoid of F VIII R:Ag). The fractions (L — VIII) not bound to the insolubilized immunoglobulins were assayed for protein, and blood group A, B/O activities.

In an artificial contamination experiment, 0.5 ml commercial A and B blood group substances (Benasil Corporation, Miami) were added to 2.5 ml of a preparation of VIII + obtained from O group blood, incubated 1 hr at 37°C, and further submitted to gel filtration and affinity chromatography.

Preparation of factor VIII/vWf glycans

Two different chemical treatments were performed on preparations L — VIII obtained from therapeutic concentrates prepared from pooled plasmas. After lipid extraction by chloroform-methanol one part of the preparation was submitted to alkaline-borohydride treatment in the condition described by AMINOFF *et al.* [10]. The mixture of reduced oligosaccharides corresponding to O-linked glycans and peptides with N-linked glycans was desalted by gel filtration on Biogel P 2. Hydrazinolysis according to BAYARD *et al.* [11] was performed on the other part of one delipidated preparation; this procedure specifically cleaves asparaginyl-glucosaminyl linkages and destroys O-glycans. The glycans released were further desalted and re-N-acetylated as described by READING *et al.* [12].

Hemagglutination inhibition assays

Samples of factor VIII (50 μ l) to be assayed were serially diluted 2 fold with 20 mM Imidazole - HCl, 0.14 M NaCl pH 7.2 and incubated

A AND B BLOOD GROUPS IN F.VIII/v.Wf

2 hr at 22°C with 50 µl of appropriately diluted antisera (prepared by the C.R.T.S., Lille; anti-A and anti-B were human sera and anti-H lectin was prepared from *Ulex Europaeus*). To this solution were then added 100 µl of a 3% suspension of appropriate erythrocytes (A, B or O). Incubation was for 60 min at 22°C. The results of blood group activity were expressed as the concentration of protein from each factor VIII preparation required to prevent agglutination.

Monosaccharide analysis

The amino sugars were identified and measured by gas-liquid chromatography after methanolysis and trifluoroacetylation using the technique described by ZANETTA *et al.* [13].

RESULTS

The results reported (Table I) show that F VIII/vWf isolated by gel filtration of AHA concentrates prepared from pooled plasmas (VIII +) inhibits the agglutination of A, and B erythrocytes by anti-A and anti-B sera respectively. This inhibition persisted even after ultimate purification of F VIII/vWf by immuno-affinity (L-VIII). However, both preparations, VIII + and L-VIII failed to inhibit anti-H serum.

TABLE I

Type A and B blood group activity of human factor VIII/vWf isolated from therapeutic AHA concentrates by gel filtration (VIII +) or immuno-affinity (L-VIII).

SAMPLE	MINIMUM AMOUNT OF PROTEIN (µg) REQUIRED FOR HEMAGGLUTINATION INHIBITION OF DILUTED SERUM		
	Anti-A	Anti-B	Anti-H
VIII +	4	8	> 256
L-VIII	8	8	> 256

The results of analysis of preparations VIII + purified from individual plasmas of patients with different ABO phenotypes are reported in Table II. They give evidence that F VIII/vWf obtained from blood with O activity did not inhibit anti-A nor anti-B sera (3 experiments). On the other hand, F VIII/vWf purified from plasmas of AB donors inhibited both antisera. F VIII/vWf isolated from A blood inhibits anti-A but not anti-B serum and vice-versa. It is

MAZURIER C. and coll.

therefore evident that for the different samples of F VIII/vWf tested, inhibition of hemagglutination reflected the ABO activity of the blood from which they were isolated.

TABLE II

Type A and B blood group activities of fraction L-VIII isolated from plasma of different ABO phenotypes.

ABO PHENOTYPE	MINIMUM AMOUNT OF PROTEIN (μ g) REQUIRED FOR HEMAGGLUTINATION INHIBITION OF DILUTED SERA	
	Anti-A	Anti-B
O	> 103, > 147, > 418	> 103, > 147, > 418
AB	90	1.4
A	7.2	230
B	370	1.44

As shown in Table III, a mixture of F VIII/vWf from O blood (VIII + O) and A and B blood group substances submitted to the same purification steps as F VIII/vWf from AHA therapeutic concentrates give VIII + and L-VIII preparations inhibiting hemagglutination of A and B erythrocytes. It is thus probable that the blood group activity is due to contamination.

TABLE III

Persistence of A and B blood group activity during purification of F VIII/vWf from O blood with added A and B blood group substances.

PREPARATION	MINIMUM AMOUNT OF PROTEIN (μ g) REQUIRED FOR HEMAGGLUTINATION INHIBITION	
	Anti-A	Anti-B
F VIII/vWf from O blood (VIII + O):	> 418	> 418
Mixture of VIII + O and A, B substances:	0.39	0.39
Fraction obtained in V_0 after gel filtration of the mixture described above:	0.84	0.84
Effluent obtained during immunofluorescence of the V_0 described above:	1	2

In order to determine whether blood group activities were really part of the F VIII/vWf molecule, we analyzed glycans of factor VIII (Table IV). Carbohydrate analysis of native factor VIII/vWf

A AND B BLOOD GROUPS IN F.VIII/v.Wf

which inhibits anti-A and anti-B sera identified the presence of GlcNac and GalNac. This result is in favour of the simultaneous presence of O- and N-linked glycans, and was supported by further experiments [14]. To carry specific A blood group activity, the GalNac residues must be in non-reducing terminal positions, α 1 \rightarrow 3 linked to Gal residues of oligosaccharides with the H determinant. As β -elimination reduced all the GalNac residues of factor VIII/vWf (Table IV, B), it can be concluded that all the GalNac residues are implicated in the linkage with serine or threonine residues of the peptidic chain. This result is confirmed in part C of Table IV showing that the N-glycans of F VIII/vWf do not contain GalNac. Moreover, the hemagglutination assays give evidence that neither 7.2 μ g of a mixture of O- and N-linked glycans nor 50 μ g of N-linked glycans are able to inhibit hemagglutination of A and B erythrocytes.

TABLE IV

Amino sugar values and hemagglutination inhibition assays obtained with:

		A	B	C
PERCENTAGE OF	$\left\{ \begin{array}{l} \text{GlcNac} \\ \text{GalNac} \\ \text{GalNac-ol} \end{array} \right.$	3.4	3.3	3.3
		0.76	0	0
		0	0.8	0
Minimum amount of monosaccharides (μ g) required for hemagglutination inhibition of diluted sera.	anti-A	1.15	> 7.2	50
	anti-B	1.15	> 7.2	50

A = Native L-VIII preparation.

B = Mixture of glycans and glycopeptides released by alkaline-borohydride.

C = Glycans obtained after hydrazinolysis of L-VIII.

DISCUSSION

The first part of this report confirms the observation of SODETZ *et al.* [7] concerning the presence of A and B blood group activities in purified preparations of human factor VIII/vWf isolated from pooled plasmas. The minimum amount of glycoprotein inhibiting anti-A serum reported by these authors was 0.8 μ g. In conditions of hemagglutination somewhat different, and using twice their concentration of antisera, we found that our preparation of F VIII/vWf inhibited anti-A at a minimum concentration of 4 μ g. The amount

MAZURIER C. and coll.

of F VIII/vWf which inhibits anti-H serum was not stated precisely by SODETZ. We failed to demonstrate this anti-H inhibition with our preparation but this result is not surprising since ROUGER *et al.* [15] have reported that only immune anti-H permits the detection of H substance in plasma.

As we have shown the existence of a relationship between plasma substances and the inhibition of hemagglutination of F VIII/vWf preparations, and as the ability of factor VIII/vWf complex to adsorb different molecules (suggested by the presence of albumin, IgG and IgM in the void volume fractions of a Biogel A 50-M column) is known, we postulated that the blood group activities demonstrated could be due to contamination of factor VIII/vWf by plasma substances carrying A, B/O oligosaccharide structures. Furthermore, the demonstration of AB blood group activity in a preparation of F VIII/vWf obtained after gel filtration of a mixture of A and B glycoproteic substances and F VIII/vWf isolated from O blood group plasma also supports this hypothesis.

Finally, direct analysis of glycans of F VIII/vWf released by β -elimination or hydrazinolysis rules out the possibility that oligosaccharides either O-linked or in an alkaline-stable linkage to the polypeptide, carry A and B blood group activities. This result is in contradiction with the conclusion of SODETZ *et al.* [7] who assume that N-linked glycans of F VIII/vWf support A, B/O blood group activity.

The problem remains why F VIII/vWf preparations which have no glycanic structures able to support A, B/O blood group activity inhibit hemagglutination of A and B erythrocytes. As minute amounts of oligosaccharides with A B/H determinants inhibit hemagglutination (for example, 4 ng of glycans of asialo-submaxillary mucine are sufficient to inhibit hemagglutination of A erythrocytes [7]) our explanation is that there are some minor contaminants adsorbed on F VIII/vWf which carry blood group activity. It is possible that these contaminants do not appear during direct analysis of glycans because they are glycolipidic in nature and are in fact extracted by the chloroform-methanol treatment which precedes β -elimination and hydrazinolysis. SODETZ *et al.* considered this explanation but excluded it because 97% of the GalNAc residues are recovered in protein fractions after lipid extraction. However, less than 3% of the GalNAc of factor VIII/vWf may be sufficient to inhibit hemagglutination of A erythrocytes.

The experiments presented in this paper do not yet permit the definition of the nature of oligosaccharides carrying A, B/O blood

A AND B BLOOD GROUPS IN F.VIII/vWf

group activity in F VIII/vWf preparations but exclude the possibility that one of the N- or O-glycans of F VIII/vWf possesses A, B/O determinants.

SUMMARY

This report presents further progress on the characterization of blood group activities associated with F VIII/vWf. Evidence is provided that a relationship exists between the nature of the soluble blood group substance of plasma and of F VIII/vWf isolated from this plasma. A mixture of F VIII/vWf from O blood group plasma with A and B substances leads to a purified F VIII/vWf with AB blood group activity. Furthermore, chemical analysis of glycans released from F VIII/vWf by alkaline-borohydride treatment or hydrazinolysis shows the absence of N-acetylgalactosamine residues in non-reducing terminal positions. These results suggest that the blood group activity of F VIII/vWf preparations may be related to minor contamination of this molecule by glycolipidic or glycoprotein plasma components with A or B oligosaccharide structures.

RESUME

Une activité de groupe sanguin A, B/O est associée au facteur VIII/vWf. Nous montrons tout d'abord, par inhibition d'hémagglutination, que cette activité est identique à celle du sang dont il est isolé.

L'analyse chimique des glycanes libérés par β -élimination ou par hydrazinolysé du facteur VIII/vWf purifié à partir de concentrés thérapeutiques (pool de plasmas de donneurs de tous phénotypes A, B/O), ne permet pas de mettre en évidence de résidus de N-acétylgalactosamine en position terminale non réductrice. En conséquence, aucun des glycanes du facteur VIII/vWf, qu'il soit lié O- ou N-glycosidiquement à la copule protéinique, ne peut être le support de la séquence oligosaccharidique spécifique de l'activité de groupe A précédemment mise en évidence.

Nous avons montré qu'en mélangeant du facteur VIII/vWf préparé à partir de plasmas de sujets O avec des substances A et B solubles on obtient, après purification, du facteur VIII/vWf doué d'activité de groupe A et B. Connaissant la capacité du facteur VIII/vWf d'absorber diverses molécules, en particulier l'albumine, les IgG et les IgM, ce résultat peut s'expliquer par adsorption des substances sur le facteur VIII/vWf. Nous suggérons donc que ce sont

MAZURIER C. and coll.

des contaminants plasmatiques mineurs, de nature glycolipidique ou glycoprotéinique, qui confèrent au facteur VIII/vWf son activité de groupe A, B/O.

Request reprints from :
Dr. Claudine MAZURIER,
C.R.T.S.,
Laboratoire d'Hémostase
21, rue C. Guérin,
59012 LILLE.

REFERENCES

- [1] FUKUI H. — Some biological aspects of von Willebrand factor. *Proc. XIth Cong. W.F.H.*, 71, 1976.
- [2] GRALNICK H.R. — Factor VIII/von Willebrand factor protein. Galactose a cryptic determinant of von Willebrand factor activity. *J. Clin. Invest.*, 62, 496, 1978.
- [3] MORISATO D.K. and GRALNICK H.R. — Selective binding of factor VIII/vWf to human platelets. *Blood*, 55, 9, 1980.
- [4] SODETZ J.M., PIZZO S.V. and MCKEE P.A. — Relationship of sialic acid to function and in vivo survival of human factor VIII/von Willebrand factor protein. *J. Biol. Chem.*, 252, 5538, 1977.
- [5] SODETZ J.M., PAULSON J.C., PIZZO S.V. and MCKEE P.A. — Carbohydrate on human factor VIII/von Willebrand factor. Impairment of function by removal of specific galactose residues. *J. Biol. Chem.*, 253, 7202, 1978.
- [6] KAO K.J., PIZZO S.V., MCKEE P.A. — Factor VIII/von Willebrand protein. Modification of its carbohydrate causes reduced binding to platelets. *J. Biol. Chem.*, 255, 10134, 1980.
- [7] SODETZ J.M., PAULSON J.C. and MCKEE P.A. — Carbohydrate composition and identification of blood group A, B and H oligosaccharide structures on human factor VIII/von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.*, 254, 10754, 1979.
- [8] MAZURIER C., SAMOR B., PARQUET-GERNEZ A., FOURNET B., GOUEMAND M. and MONTREUIL J. — Chemical composition of factor VIII. In: *Protides of Biological Fluids*. Ed. H. Peeters, 28, 299, 1980.
- [9] MAZURIER C., PARQUET-GERNEZ A., SAMOR B., GOUEMAND M. and MONTREUIL J. — Etude de l'antigène lié au facteur VIII (F VIII R : Ag). Purification par chromatographie d'immuno-affinité. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 288, 1431, 1979.
- [10] AMINOFF D., GATHMANN W.D., MCLEAN C.M., YADOMAE T. — Quantitation of oligosaccharides released by the β -elimination reaction. *Anal. Biochem.*, 101, 44, 1980.

A AND B BLOOD GROUPS IN F.VIII/v.W/

- [11] BAYARD B. and MONTREUIL J. — Notes du Colloque International N° 221 du C.N.R.S. sur les glycoconjugués. Villeneuve-d'Ascq, 20-27 juin 1973, Editions du C.N.R.S., Paris, 209, 1974.
- [12] READING C.L., PENHOET E. and BALLOU C. — Carbohydrate structure of vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 253, 5600, 1978.
- [13] ZANETTA J.P., BREKENRIDGE W.C. and VINCENDON G. — Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methylglycosides as trifluoro-acetate derivatives. Application to glycoproteins and glycolipids. *J. Chromatogr.*, 69, 291, 1972.
- [14] SAMOR B., MAZURIER C., GOUEMAND M., DEBEIRE P., FOURNET B., MONTREUIL J. — Preliminary results on the carbohydrate structures of antihemophilic A factor. Submitted for publication.
- [15] ROUGER P., RIVEAU D. and SALMON C. — Detection of the H and I blood group antigens in normal plasma. *Vox Sang.*, 37, 78, 1979.



L'ensemble des résultats présentés concourt à nous faire penser que ce sont des contaminants, non détectables par des techniques immunologiques, du F VIII/vwf qui sont à l'origine de l'activité A et B des préparations de F VIII/vwf. Cette hypothèse n'est compatible avec les résultats de SODETZ et al. (725) que si le procédé de délipidation qu'ils appliquent à leur préparation sans en modifier l'activité de groupe, est insuffisant. Personnellement, au cours des délipidations nous avons obtenu des agrégats, insolubles en milieu aqueux, que nous n'avons pu analyser par technique d'inhibition d'hémagglutination et, de ce fait, nous n'avons pu vérifier ce point.

VII. - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DU N-GLYCANNE MAJEUR DU FACTEUR VIII/vWF HUMAIN

Cette étude récente qui a abouti à la connaissance de la structure complète du glycanne représentant plus de 40 % de la copule glycannique du F VIII/vwf est le fruit de collaborations. Pour notre part, en collaboration avec B. SAMOR, nous avons contribué à la préparation et aux contrôles de pureté du F VIII/vwf ; l'isolement et l'étude de la composition et de la séquence des monosaccharides du N-glycanne majeur ont été réalisés essentiellement par P. DEBEIRE dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I, sous la direction du Professeur J. MONTREUIL, enfin, leurs résultats ont été confirmés et complétés par une étude en spectroscopie NMR, de H. Van HALBEEK et de J. VLIEGENTHART, dans le département de chimie bio-organique de l'Université d'Utrecht.

STRUCTURE DETERMINATION OF THE MAJOR ASPARAGINE-LINKED SUGAR CHAIN OF HUMAN FACTOR VIII/VON WILLEBRAND FACTOR.

I - INTRODUCTION

Human factor VIII/von Willebrand factor (F VIII/vWf) is a complex containing a coagulant activity (F VIII : C) and an activity required for normal platelet hemostatic function which is carried by a factor VIII - related antigen (F VIII R : Ag) and measured by its ability to agglutinate normal washed human platelets in the presence of ristocetin (F VIII R : RCo). Recent studies suggest that the carbohydrate moiety of F VIII/vWf is important for the binding of the latter to platelets in the presence of ristocetin and for the *in vivo* survival of the protein [1-7]. We have previously demonstrated that the carbohydrate moiety of F VIII/vWf contains N- and O-glycosidically linked glycans. After hydrazinolysis, a major glycan of the N-acetyl-lactosaminic type has been characterized by thin-layer chromatography [8]. In this paper, on the basis of the carbohydrate composition and the results of methylation analysis, mass spectrometry and 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy, we describe the primary structure of this major glycan.

2 - MATERIALS AND METHODS

Human F VIII/vWf was purified from therapeutic concentrates according to a procedure previously described [9].

A lyophilized and delipidated F VIII preparation (10 mg) was hydrazinolysed according to Bayard and Montreuil [10] and the liberated, N-deacetylated glycans were N-reacetylated, first with

[¹⁴C]-acetic anhydride (C.E.A., 5-10 mCi/mM) and then with non-labelled acetic anhydride [11]. The liberated glycans were separated by high-voltage electrophoresis on Whatman 3MM paper in the buffer : pyridine / acetic acid / water (18 : 6 : 2320 v/v ; pH 5.4) [12], at 75 V/cm. The radioactive spots were cut and eluted with water. Following standards were used : desialylated (A), monosialylated (B) and disialylated (C) glycans of the N-acetylglucosaminic type prepared from human serum transferrin [13] by hydrazinolysis.

Molar ratios of neutral monosaccharides, N-acetylhexosamines and N-acetylneuraminic acid were determined after methanolysis and trifluoroacetylation by gas-liquid chromatography [14]. Permethylation of oligosaccharides (200 µg) was carried out according to Finne et al. [15]. Methylglycosides resulting from methanolysis of permethylated oligosaccharides were identified by gas-liquid chromatography-mass spectrometry according to Fournet et al. [16].

For NMR analysis the oligosaccharide fraction 3 (200 µg) was repeatedly exchanged in D₂O (99.96 atom % D, Aldrich), after adjustment of the pH of the solution to 7. The 500-MHz ¹H-NMR spectrum was recorded on a Bruker WM-500 spectrometer, operating in the Fourier transform mode at a probe temperature of 27°C (for further experimental details, see [17]). Chemical shifts are given relative to sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulphonate (indirectly to acetone in D₂O : δ = 2.225 ppm).

3 - RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Separation of N-glycosidically linked glycans by high-voltage electrophoresis

By high-voltage electrophoresis of the [^{14}C]-N-reactylated glycans released from F VIII/vWf by hydrazinolysis, five fractions were obtained (see fig. 1), which are constituted of neutral (fraction 1), monosialylated (fractions 2 and 3) and disialylated (fractions 4 and 5) oligosaccharides. These fractions appear to be heterogeneous by paper electrophoresis and/or by thin-layer chromatography, except the major fraction 3.

3.2. Carbohydrate composition of the N-glycosidic carbohydrate chains

The molar carbohydrate composition of the five fractions is given in table 1. The sugar moiety of fraction 3 represents 60 % of the total amount of the N-glycosidically linked oligosaccharides of F VIII/vWf. The structural investigations were carried out on this major and homogeneous fraction.

3.3. Primary structure determination

The primary structure of the major N-glycosidic glycan of F VIII/vWf was established by 500-MHz ^1H -NMR spectroscopy, in conjunction with permethylation analysis. The results of the latter are compiled in table 2.

The 500-MHz ^1H -NMR spectrum of F VIII/vWf fraction 3

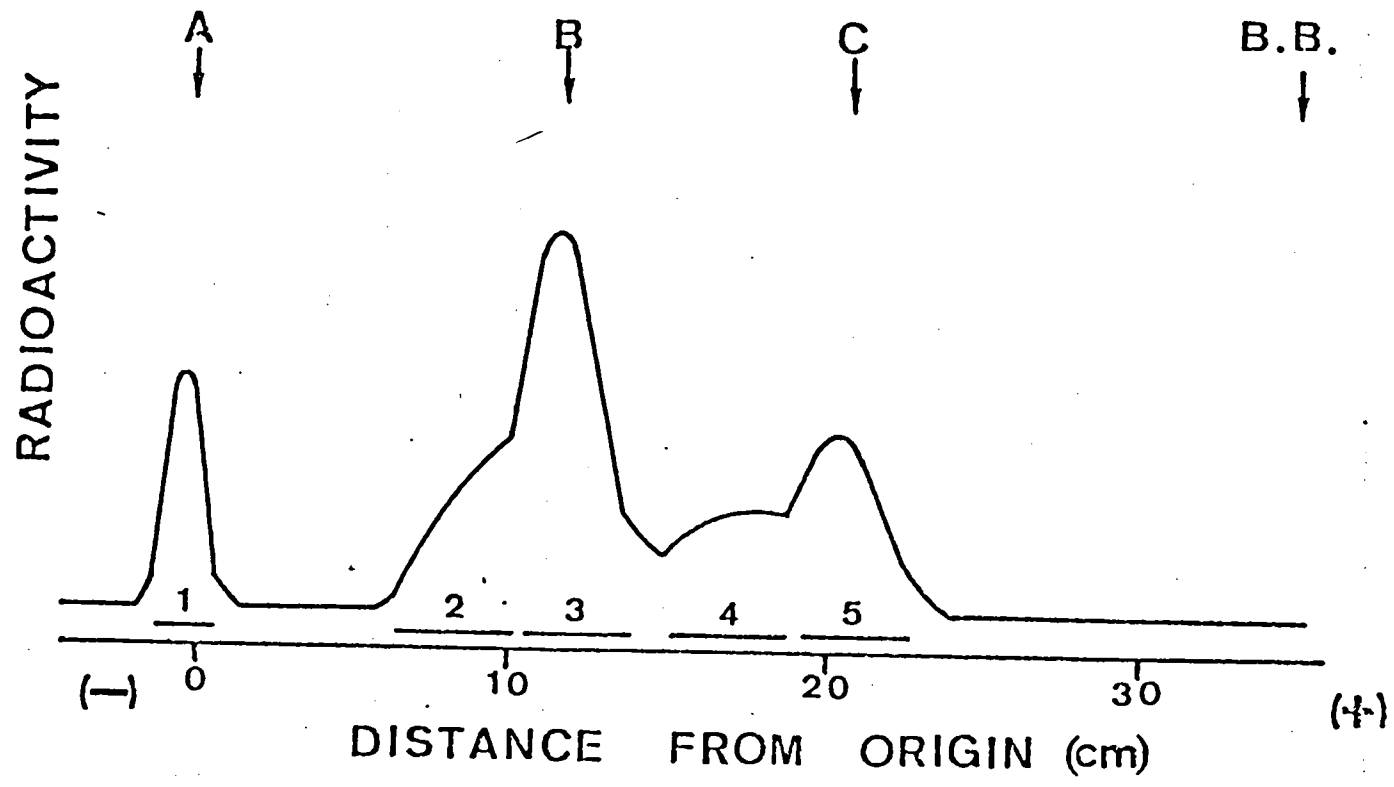


FIGURE 1



RADIOELECTROPHOREGRAM OF THE OLIGOSACCHARIDES RELEASED FROM F VIII/vWF BY HYDRAZINOLYSIS

(FOR DETAILS OF THE EXPERIMENTAL PROCEDURE, SEE MATERIALS AND METHODS).

Table 1


Molar carbohydrate composition (a) of the oligosaccharides released from F VIII/vWf by hydrazinolysis and separated by high voltage electrophoresis.

Mono-saccharide	Combined oligo-saccharides	Fraction				
		1	2	3	4	5
Man	3	3	3	3	3	3
Gal	2.6	3	3.4	2	3.4	3
Fuc	1.6	2	2	1.2	traces	1.2
GlcNAc	4.3	4	4.8	4.2	4	4.8
GalNAc	-	-	-	-	-	-
NeuAc	1.2	-	0.85	1	1.6	2
Tentesimal sugar content for each fraction (%)	100	10	8	60	6	16

(a) Calculated on the basis of 3 mannose residues / molecule.

Table 2

Molar ratios ^(a) of monosaccharide methyl ethers present in the methanolysate of the permethylated major N-glycan isolated from F VIII/vWf.



Monosaccharide methyl ethers	Fraction 3
(2,3,4)-Me ₃ -Fuc	0.8
(2,3,4,6)-Me ₄ -Gal	1.0
(2,3,4)-Me ₃ -Gal	1.2
(3,4,6)-Me ₃ -Man	2
(2,4)-Me ₂ -Man	1.2
(3,6)-Me ₂ -GlcNAc(Me)	2.6
(3)-Me ₁ -GlcNAc(Me)	0.8
(4,7,8,9)-Me ₄ -NeuAc(Me)	0.9

(a) The molar ratios were calculated on the basis of 2 residues of (3,4,6)-Me₃-Man.

shows the characteristic features of an oligosaccharide of the N-acetylactosaminic type, derived from a carbohydrate unit N-glycosidically linked to asparagine of a glycoprotein. The presence of the usual mannotriose (4-3-4') branching core is clearly deducible from the occurrence of the Man H-1 and H-2 signals. For Man-4, they are found at $\delta = 5.133$ and 4.195 ppm ; for Man-3, at $\delta = 4.78$ and 4.253 ppm ; and for Man-4', at $\delta = 4.926$ and ≈ 4.11 ppm, respectively. From these chemical shifts it can be concluded that a diantennary type of branching is concerned [17].

As to the extension of the core at the peripheral side, one of the two N-acetylactosamine units that are $\beta(1\rightarrow2)$ -linked to Man-4 and -4', bears a NeuAc residue in $\alpha(2\rightarrow6)$ -linkage to Gal. Evidence stems from the chemical shifts ($\delta_{\text{H-3ax}} = 1.718$ ppm ; $\delta_{\text{H-3eq}} = 2.669$ ppm ; $\delta_{\text{NAc}} = 2.030$ ppm) and the relative intensities of the NeuAc structural-reporter groups (cf. [17]), as well as from the presence of two distinct sets of reporter-group signals for the N-acetylactosamine units. The sialylated branch possesses the anomeric doublets of Gal and GlcNAc at $\delta = 4.445$ and 4.606 ppm, respectively. The asialo counterpart shows H-1 doublets for Gal and GlcNAc at $\delta = 4.469$ and 4.581 ppm, respectively. Localization of NeuAc in a certain branch could be readily achieved on the basis of the chemical shifts of the α -Man H-1 signals [17]. The chemical shift value for H-1 of Man-4 ($\delta = 5.133$ ppm) points unambiguously to the presence of the $\alpha(2\rightarrow6)$ -linked NeuAc in the upper (i.e., 4-5-6) branch, whereas $\delta_{\text{H-1}}$ for Man-4' (4.926 ppm) confirms the asialo character of the lower branch. This location of the NeuAc residue in the upper branch is

corroborated by the chemical shifts of the N-acetyl signals of GlcNAc-5 ($\delta = 2.069$ ppm, pointing to (2 \rightarrow 6)-sialylation of the 5-6 branch) and GlcNAc-5' ($\delta = 2.048$ ppm, indicating that Gal-6' is the terminal residue in the lower branch) [17] .

Regarding the extension of the core at the reducing end, the Man-3 is $\beta(1\rightarrow4)$ -linked to an N,N'-diacetylchitobiose unit which bears a Fuc residue in $\alpha(1\rightarrow6)$ -linkage to GlcNAc-1. The presence of the GlcNAc- $\beta(1\rightarrow4)$ [Fuc $\alpha(1\rightarrow6)$] GlcNAc structural element comes to expression in the occurrence of doublets for the anomeric protons of GlcNAc-2 ($\delta_{H-1} \approx 4.68$ ppm) and Fuc ($\delta_{H-1} \approx 4.87$ ppm). The H-5 and CH₃ signals of Fuc, at $\delta \approx 4.11$ and 1.208 ppm, respectively point to its $\alpha(1\rightarrow6)$ -linkage to GlcNAc-1. In addition to the chemical shift for H-1 of GlcNAc-2, the position of its N-acetyl signal is decisive for the presence of Fuc in $\alpha(1\rightarrow6)$ -linkage to GlcNAc-1 [17] . The latter signal is, for the larger part (90 %), observed at $\delta = 2.096$ ppm, whereas only a minor part is found at $\delta = 2.080$ ppm, indicating that most of the chains bear such a Fuc residue.

Based on the aforementioned NMR results, and those of the methylation analysis (see table 2), the primary structure of F VIII/vWf fraction 3, representing the major N-glycosidic glycan of this glycoprotein, is established to be as depicted in fig. 2. The structure is identical to that of human lactotransferrin glycopeptide D [18] , and also to that of glycopeptide fraction B, derived from secretory immunoglobulins A from human milk [19] . Comparison of the 500-MHz ¹H-NMR data for the F VIII/vWf fraction 3 described in this paper with those acquired at 360 MHz for the aforemen-

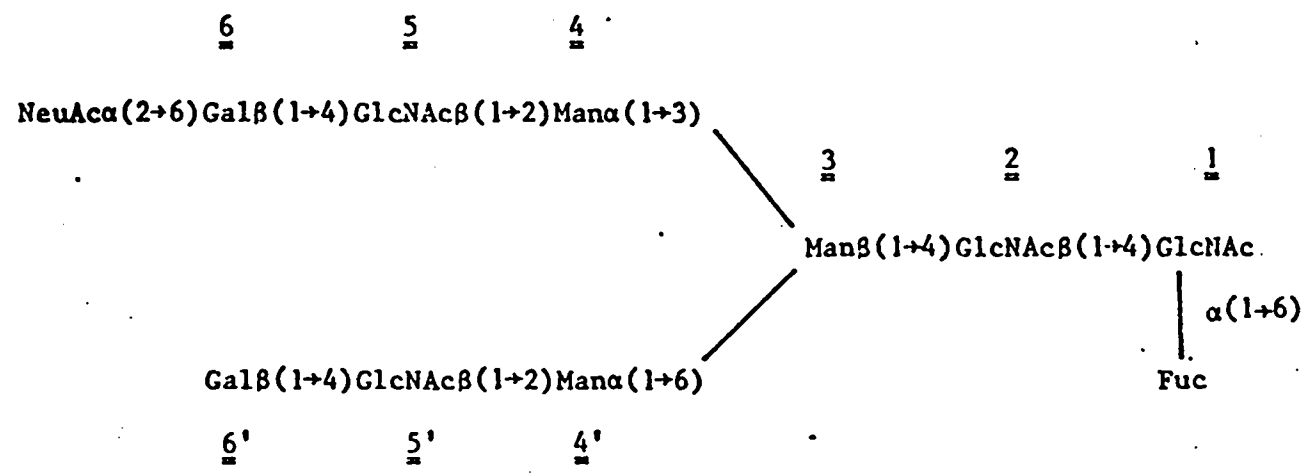


FIGURE 2

PRIMARY STRUCTURE OF THE MAJOR N-GLYCOSIDIC GLYCAN OF F VIII/vWF

tioned glycopeptides reveals that the reducing character of the oligosaccharide released by hydrazinolysis and N-reacetylation does not markedly influence the chemical shifts of the structural-reporter groups of Fuc (1→6)-linked to GlcNAc-1 nor those of GlcNAc-2, β(1→4)-linked to GlcNAc-1. Obviously, the reporter-groups of GlcNAc-1 differ considerably when comparing oligosaccharide and glycopeptides (e.g., the NAc resonance of GlcNAc-1 is found here at $\delta = 2.039$ ppm). Nevertheless, it should be emphasized that this study shows again the general applicability of the structural-reporter-group concept for the identification of glycopeptides, oligosaccharides and oligosaccharide-alditols [17,20] .

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (LA n° 217), by the Délégation Générale à la Recherche Scientifique (Contrat 81-L-0433), by the Centre Régional de Transfusion Sanguine, by the Fondation pour la Recherche Médicale and by the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) with financial aid from the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO), and by grant UUKC-OC 79-13 from the Netherlands Foundation for Cancer Research (KWF). We thank Yves Leroy for his expert technical assistance.

REFERENCES

1. - Sodetz, J.M., Pizzo, S.V. and Mc Kee, P.A. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5538-5546.
-

2. - Gralnick, H.R. (1978) J. Clin. Invest. 62, 496-499.
3. - Sodetz, J.M., Paulson, J.C., Pizzo, S.V. and Mc Kee, P.A. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7202-7206.
4. - Kao, K.J., Pizzo, S.V. and Mc Kee, P.A. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10134-10139.
5. - Morisato, D.K. and Gralnick, H.R. (1980) Blood, 55, 9-15.
6. - De Marco, L. and Shapiro, S.S. (1981) J. Clin. Invest. 68, 321-328.
7. - Gralnick, H.R., Cregger, M.C. and Williams, S.B. (1982) Blood, 59, 542-548.
8. - Samor, B., Mazurier, C., Goudemand, M., Debeire, P., Fournet, B. and Montreuil, J. (1982) Thromb. Res. 25, 81-89.
9. - Mazurier, C., Parquet-Gernez, M., Samor, B., Goudemand, M. and Montreuil, J. (1979) C.R. Acad. Sc. Paris, 288, 1431-1434.
10. - Bayard, B. and Montreuil, J. (1974) in : Méthodologie de la structure et du métabolisme des glycoconjugués (Montreuil, J. ed.) Coll. Intern. C.N.R.S.n° 221, Editions du C.N.R.S., Paris, pp. 209-218.
11. - Reading, C.L., Penhoet, E. and Ballou, C. (1978) J. Biol. Chem. 253, 5600-5612.
12. - Crimmonprez, L. and Montreuil, J. (1968) Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 843-855.

13. - Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. and Montreuil, J. (1975) FEBS-Lett. 50, 296-299.
 14. - Zanetta, J.P., Breckenridge, W.C. and Vincendon, G. (1972) J. Chromatogr. 69, 291-301.
 15. - Finne, J., Krusius, T. and Rauvala, H. (1980) Carbohydr. Res. 80, 336-339.
 16. - Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. and Montreuil, J. (1981) Anal. Biochem. 116, 489-509.
 17. - Vliegthart, J.F.G., Van Halbeek, H. and Dorland, L. (1981) Pure Appl. Chem. 53, 45-77.
 18. - Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., Van Halbeek, H. and Vliegthart, J.F.G. (1982) Eur. J. Biochem. 121, 413-419.
 19. - Pierce-Crétel, A., Pamblanco, M., Strecker, G., Montreuil, J., Spik, G., Dorland, L., Van Halbeek, H. and Vliegthart, J.F.G. (1982) Eur. J. Biochem. 125, 383-388.
 20. - Vliegthart, J.F.G., Dorland, L. and Van Halbeek, H. (1982) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 41 (in the press).
-



C O N C L U S I O N S



Nos recherches ont permis de contribuer à mieux connaître le F VIII/vWf notamment dans le domaine immunologique, diagnostique thérapeutique et biochimique.

En ce qui concerne le domaine immunologique, notre étude sur l'action de divers anticorps polyclonaux sur le F VIII et le F vWf a montré que :

1°) Il existe des différences essentielles entre l'action d'un sérum homologue de malade révélant une activité anticoagulante anti-VIII:C et celle de sérums hétérologues de lapins immunisés avec des fractions riches en facteur VIII et qui montrent également une activité inhibitrice anti-VIII:C. Les premiers n'inhibent pas la rétention de plaquettes sur billes de verre de sang normal ou d'hémophile alors que les seconds la diminuent et l'annihilent même parfois sans qu'il y ait cependant de relation entre le titre d'anticorps anti-VIII:C et l'intensité de l'effet inhibiteur de la rétention des plaquettes sur billes de verre. Il apparaît donc que :

a) le sérum homologue étudié contient essentiellement des anticorps qui agissent sur le facteur VIII mais qu'il ne comporte pas d'anticorps capables de neutraliser le site du F vWf responsable de la rétention des plaquettes aux billes de verre.

b) les sérums hétérologues de lapin qui ont la propriété de précipiter en formant un complexe avec le F vWf et de neutraliser l'activité coagulante du facteur VIII contiennent deux types d'anticorps indépendants : les uns sont dirigés contre

le facteur VIII et sont responsables de l'activité anti-VIII:C de ces sérums tandis que les autres sont dirigés spécifiquement contre le F vWf car ils agissent aussi bien sur le sang normal ou d'hémophile A majeur.

2°) Dans certaines conditions, des anticorps homologues isolés du plasma d'un hémophile A polytransfusé et d'un malade ayant spontanément développé un anticoagulant anti-VIII:C, sont capables de fixer le F vWf. Plusieurs éventualités peuvent expliquer ces résultats et des expériences complémentaires seraient nécessaires pour conclure ce chapitre ;

a) existe-t-il, contrairement à ce que l'on pense actuellement, une certaine communauté antigénique entre le F VIII et le F vWf ?

b) ou existe-t-il, dans le sérum de certains malades avec inhibiteur anti-VIII:C puissant, du à des anticorps anti-F VIII, une petite proportion d'anticorps dirigés contre le F vWf qu'on ne pourrait cependant mettre en évidence, ni par des réactions de précipitation ni par la recherche d'inhibition des activités liées au F vWf.

3°) Il est possible de doser le F VIII R:Ag par une technique de dosage immuno-enzymatique telle que la technique ELISA que nous avons mise au point et qui requiert la préparation d'anticorps hétérologues, se liant au VIII R:Ag, couplés à de la peroxydase. Cette technique, beaucoup plus sensible que la technique d'électro-immunodiffusion quantitative, a, en outre, l'avantage tout comme les techniques radioimmunologiques, de ne pas être dépendante de la mobilité électrophorétique du VIII R:Ag à doser et d'être adaptée au dosage en série d'un grand nombre d'échantillons.

Dans le domaine diagnostique et thérapeutique, nos travaux ont présenté les intérêts suivants :

1°) Sur le plan du diagnostic, nous avons effectué, comme bien d'autres équipes, une étude comparative dans une population de femmes normales ou conductrices certaines d'hémophilie A, du rapport entre les taux d'activité coagulante VIII:C et d'anticorps VIII R:Ag.

a) le rapport de ces deux valeurs liées, l'une au taux F VIII, l'autre à celui du F vWf, est en quelque sorte une constante biologique puisqu'il n'est pas modifié, chez un même individu, dans des circonstances où nous avons montré que le taux d'activité VIII:C est augmenté (après exercice musculaire, en fin de grossesse, au milieu du cycle menstruel).

b) le dosage du VIII R:Ag est un élément très intéressant pour pouvoir assurer qu'une femme est conductrice d'hémophilie car la majorité des conductrices certaines, qui ont un taux de VIII:C se situant dans les limites de ceux trouvés chez les femmes normales, se distinguent de ces dernières par le fait qu'elles ont un rapport VIII:C/VIII R:Ag inférieur à celui trouvé dans une population témoin.

2°) Nous avons également pu mettre en évidence un état pathologique acquis simulant la maladie de Willebrand chez un homme présentant, par ailleurs, une macroglobulinémie de Waldenström et montrer qu'il existait dans une de ses fractions d'Ig G purifiées un effet inhibiteur de l'activité VIII R:RCO du F vWf normal.

3°) Nous avons mis en évidence certaines formes anormales du VIII R:Ag chez les malades vWD, en comparant les résultats du dosage immuno-enzymatique du VIII R:Ag avec ceux obtenus par la technique classique d'électro-immunodiffusion quantitative. En effet, une mobilité électrophorétique anormale du VIII R:Ag, telle qu'on la trouve dans les formes appelées maintenant II A de la maladie de Willebrand, peut induire des discordances entre les taux obtenus par les deux techniques, dues à une erreur par excès des résultats obtenus par électrophorèse.

4°) Nos expérimentations ont eu également un intérêt sur le plan thérapeutique car nous avons mis au point une technique de préparation de concentrés de F VIII/vWf qui se sont avérés efficaces pour le traitement des hémophiles A et des patients atteints de vWD. Cette préparation a donc, contrairement aux autres concentrés thérapeutiques de F VIII, la capacité de corriger l'hémostase primaire des vWD et ceci nous paraît être en relation avec le fait qu'elle contient une grande proportion de formes polymérisées du F vWf.

Enfin, en ce qui concerne le problème de l'étude biochimique du F VIII/vWf, le bilan des recherches est le suivant :

1°) Nous avons montré les limites de certaines techniques d'isolement du F VIII/vWf en mettant en évidence, par un contrôle immunologique minutieux, le fait que différents contaminants, qu'on pense éliminer par tamisage moléculaire car ils ont une MM bien inférieure à celle du F VIII/vWf, s'associent en fait à ce complexe et persistent, dans des proportions où ils peuvent entacher d'erreur les études biochimiques ultérieures, dans certains types de préparation.

2°) Nous avons mis au point une technique originale de chromatographie d'affinité sur immunoglobulines de lapin immunisé avec une préparation contenant tous les constituants plasmatiques, sauf le F VIII R:Ag. Ce procédé a l'avantage de permettre d'obtenir du F VIII/vWf pur, puisque n'induisant que des anticorps précipitants anti-VIII R:Ag chez le lapin, et encore doué, du moins en partie, de ses activités biologiques dans la coagulation (VIII:C) et dans l'hémostase primaire (VIII R:RCO).

3°) Nous avons contribué à l'étude biochimique de la copule glycoprotéinique du F VIII/vWf en précisant sa composition en acides aminés et en monosaccharides. C'est vers la copule glycannique que se sont orientés les plus récents travaux. Ils ont permis de montrer l'hétérogénéité des glycannes puisqu'il existe à la fois une dizaine de O-glycannes différents qui ne peuvent comporter des oligosaccharides support de l'activité de groupe A, contrairement à ce qu'avait affirmé une autre équipe, et des glycannes liés N-glycosidiquement à la chaîne protéique. Cependant, il existe un N-glycane majeur, contenant environ 45 p.100 des monosaccharides de ce complexe moléculaire, dont la structure hypothétique a été récemment vérifiée. Il s'agit d'un glycane de type lactosaminique, bi-antenné, monosialylé dont la structure complète a été précisée p.229.

Ainsi, à l'heure actuelle, nous partageons avec d'autres équipes avec qui nous collaborons, un ensemble de techniques et de résultats qui devraient nous permettre d'acquérir, dans les prochaines années, des données intéressantes concernant le problème capital des relations structure-activité du F VIII/vWf et de mieux comprendre notamment le mécanisme de l'intervention du F vWf dans l'hémostase primaire.

Nous envisageons tout d'abord, et cette étude est déjà en cours, de mettre à profit nos connaissances actuelles sur la structure des glycanes du F VIII/vwf pour étudier le rôle de ceux-ci dans sa fixation aux plaquettes.

Nous projetons également d'essayer de miniaturiser les techniques d'étude qualitative des glycanes du F VIII/vwf, que nous avons jusqu'ici appliqué à des préparations de plusieurs milligrammes, afin de pouvoir étudier la copule glycanique des formes anormales de F VIII/vwf telles que celles isolées de plasmas de malades appelées "variant de vWD".

Enfin, mais cela ne sera possible que si nous pouvons étudier séparément le F VIII et le F vwf, nous aimerions pouvoir déterminer, au cas où le F VIII serait réellement de nature glycoprotéique, si ses glycanes interviennent dans son activité coagulante VIII:C.



B I B L I O G R A P H I E

Les références incluses dans les articles se rapportent à la bibliographie située à la fin de chaque article et ne sont pas classées ci-dessous.



	REF.	PAGE
ABILGAARD C.F., SUZUKI Z., HARRISON J., JEFcoat K., ZIMMERMAN T.S. : Serial studies in von Willebrand's disease - variability versus "variants". Blood, 1980, <u>56</u> , 712-716.	398	62
ADDIS T. : The pathogenesis of hereditary hemophilia. J. Path. Bacteriol., 1911, <u>15</u> , 427-452.	4	3
AGGELER P.M., WHITE S.G., GLENDENING M.B., PAGE E.W., LEAKE T.B., BATES G. : Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency : a new disease resembling hemophilia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1952, <u>79</u> , 692-694.	8	3
AKHMETELI M.A. <u>et al.</u> : Methods for the detection of haemophilia carriers, a memorandum. Bull. WHO. 1977, <u>55</u> , 675-702.	667	134
ALEXANDER B., GOLDSTEIN R. : Dual hemostatic defect in pseudohemophilia. J. Clin. Invest., 1953, <u>32</u> , 551.	9	4
ALLAIN J.P., COOPER H.A., WAGNER R.H., BRINKHOUS K.M. : Platelets fixed with paraformaldehyde - a new reagent for assay of von Willebrand factor and platelet aggregating factor. J. Lab. Clin. Med., 1975, <u>85</u> , 318- 328.	378 386	59 60
ALLAIN J.P., FROMMEL D. : Antibodies to factor VIII. II. Specificity and kinetics of iso and heteroantibodies in hemophilia A. Blood, 1974, <u>44</u> , 313-322.	533	86
ALLAIN J.P., FROMMEL D. : Antibodies to factor VIII. V. Patterns of immune response to factor VIII in hemophilia A. Blood, 1976, <u>47</u> , 973- 982.	518	84

	REF.	PAGE
ALLAIN J.P., GAILLANDRE A., FROMMEL D. : Acquired haemophilia : functional study of antibodies to factor VIII. <i>Thromb. Haemostas.</i> , 1981, <u>45</u> , 285-289.	534	86
ALLAIN J.P., GAILLANDRE A., LEE H. : Immunological characterization of antibodies to factor VIII in hemophilic and non hemophilic patients. <i>J. Lab. Clin. Med.</i> , 1981, <u>97</u> , 791-800.	569	90
ALLAIN J.P., VERROUST F., SOULIER J.P. : In vitro and in vivo characterization of factor VIII preparations. <i>Vox Sang.</i> , 1980, <u>38</u> , 68-80.	101	18
ALLAIN J.P., VERROUST F., SOULIER J.P. : One or two stage assay for factor VIII. <i>Lancet</i> , 1979, <u>8125</u> , 1076.	588	93
ANDERSEN B.R., TERRY W.D.: γ -G 4 globulin antibody causing inhibition of clotting factor VIII. <i>Nature</i> , 1968, <u>217</u> , 174-175.	565	90
ANDERSEN B.R., TROUP S.B. : γ -G antibody to human antihemophilic globulin (factor VIII). <i>J. Immunol.</i> , 1968, <u>100</u> , 175.	561	90
ANDERSSON L.O., BROWN J.E. : Interaction of factor VIII-von Willebrand factor with phospholipid vesicles. <i>Biochem. J.</i> , 1981, <u>200</u> , 161-167.	30 645	11 100
ANDERSSON J.C., Mc KEE P.A. :- The effects of proteolytic enzymes on the coagulant properties and molecular structure of human factor VIII. <i>Circulation</i> , 1972, <u>46</u> (Supp. 2), 52.	328	49
ATICHARTAKARN V., MARDER V.T., KIRBY E.P., BUDZINSKI A.Z. : Effects of enzymatic degradation on the subunit composition and biologic properties of human factor VIII. <i>Blood</i> , 1978, <u>51</u> , 281-297.	182	26
AUSTEN D.E.G. : Thiol groups in the blood clotting action of Factor VIII. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1970, <u>19</u> , 477-484.	632	99
AUSTEN D.E.G. : Factor VIII of small molecular weight and its aggregation. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1974, <u>27</u> , 89-100.	325	49
AUSTEN D.E.G. : The chromatographic separation of factor VIII on aminohexyl Sepharose. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1979, <u>43</u> , 669-674.	511	83
AUSTEN D.E.G., BIDWELL E. : Carbohydrate structure in factor VIII. <i>Thromb. Diath. Haemorrh.</i> 1972, <u>28</u> , 464-472.	628	99
AUSTEN D.E., CAREY M., HOWARD M.A. : Dissociation of factor VIII-related antigen into subunits. <i>Nature</i> , 1975, <u>53</u> , 55-56.	171	25
BALLARD J.O., SANDERS J.C., EYSTER M.E. : Altered serum factor VIII-related antigen (VIII:AGN) von Willebrand factor (VIII:vWf) in hemophiliacs with inhibitors to factor VIII procoagulant activity (VIII:C). <i>Thromb. Haemost.</i> , 1981, <u>45</u> , 68-72.	548 652	88 123
BARKHAN P., LAI M., STEVENSON M. : Antihemophilic factor (factor VIII) : an α 2 globulin. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1963, <u>9</u> , 499.	222	30
BARNHART M.I. : Platelet responses in health and disease. <i>Mol. Cell. Biochem.</i> , 1978, <u>22</u> , 113.	40	12

	REF.	PAGE
BARROW E.M., GRAHAM J.B. : Kidney antihemophilic factor = partial purification and some properties. <i>Biochem.</i> , 1968, <u>7</u> , 3917-3925.	492	80
BARROW E.M., GRAHAM J.B. : Factor VIII (AHF) activity of small size produced by succinylating plasma. <i>Amer. J. Physiol.</i> , 1972, <u>222</u> , 134.	323	49
BARROW E.S., GRAHAM J.B. : Blood coagulation factor VIII (antihemophilic factor) = with comments on von Willebrand's disease and Christmas disease. <i>Physiol. Rev.</i> , 1974, <u>54</u> , 23-74.	21 228	9 31
BARROW E.S., MILLER C.H., REISNER H.M., GRAHAM J.B. Genetic counselling in haemophilia by discriminant analysis 1975-1980. <i>J. Med. Gen.</i> 1982, <u>19</u> , 26-34.	669	134
BARROWCLIFFE T.W., GRAY E. : Studies of phospholipid reagents used in coagulation. I = some general properties and their sensitivity to factor VIII. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1981, <u>46</u> , 629-633.	595 643	95 100
BARROWCLIFFE T.W., KEMBALL-COOK G., GRAY E. Factor VIII inhibitor by-passing activity = a suggested mechanism of action. <i>Thromb. Res.</i> , 1981, <u>21</u> , 181-186.	644	100
BARROWCLIFFE T.W., KEMBALL-COOK G., MORRIS G., HOLT J.C., FURLONG R.A. and PEAKE I.R. : Factor VIII related activities in therapeutic concentrates. <i>J. Lab. Clin. Med.</i> , 1981, <u>97</u> , 429-438.	103	18
BARTLETT A., DORMANDY K.M., HAWKEY C.M., STABLEFORTH P., VOLLER A. : Factor VIII related antigen : measurement by enzyme immuno assay. <i>Brit. Med. J.</i> , 1976, <u>1</u> , 994-996.	351 671 673	56 et 57 135 144
BAUGH R., BROWN J., SARGEANT R., HOUGIE C. : Separation of human factor VIII activity from the von Willebrand's antigen and ristocetin platelet aggregation activity. <i>Biochim., Biophys. Acta</i> , 1974, <u>371</u> , 360-367.	216 321	29 49
BAUGH R.F., JACOBY J.C., BROWN J.E. : Collagen-induced platelet aggregation is enhanced by bovine von Willebrand factor. <i>Thromb. Res.</i> , 1979, <u>16</u> , 289-294.	51	13
BAUMGARTNER H.R. : The role of blood flow in platelet adhesion, Fibrin deposition and formation of mural thrombin. <i>Microvasc. Res.</i> , 1973, <u>5</u> , 167-179.	37 364	12 58
BAUMGARTNER H.R., TSCHOPP T.B., MEYER D. : Shear rate dependent inhibition of platelets adhesion and aggregation on collagenous surfaces by antibodies to human factor VIII/von Willebrand factor. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1980, <u>44</u> , 127-139.	46 90 288	13 16 43
BECK E.A., BACHMANN P., BARBIER P., FURLAN M. : Importance of protease inhibition in studies on purified factor VIII (antihaemophilic factor). <i>Thromb. Haemost.</i> , 1976, <u>35</u> , 186-190.	210	28
BECK P., GIDDINGS J.C., BLOOM A.L. : Inhibitor of factor VIII in mild haemophilia. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1969, <u>17</u> , 283-288.	517	84
BECK E.A., TRANQUI-POUIT L., CHAPEL A., PERRET B.A., FURLAN M., HUDRY-CLERGEON G., SUSCILLON G. : Studies on factor III-related protein. I. Ultra-structural and electrophoretic heterogeneity of human factor VIII related protein. <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 1979, <u>578</u> , 155-163.	150 184	22 26

	REF.	PAGE
BEESEER H. : Comparative investigation of factor VIII : C in factor VIII concentrates and haemophilia A patients by two stage and one stage assay methods. <i>Haemostasis</i> , 1981, 10 suppl., 206.	589	93
BEN KACEM M.M. : Etude biologique du facteur Willebrand, Thèse de doctorat d'état en pharmacie, Lille, 1976.	654	123
BENNETT B., FORMAN W.B., RATNOFF O.D. : Studies on the nature of antihemophilic factor (factor VIII). Further evidence relating the AHF-like antigens in normal and hemophilic plasmas. <i>J. Clin. Invest.</i> , 1973, <u>52</u> , 2191-2197.	112 130 175 195 331	19 21 26 27 50
BENNETT E., HUEHNS E.R. : Immunological differentiation of three types of haemophilia and identification of some female carriers. <i>Lancet</i> , 1970, <u>2</u> , 956-958.	275	41
BENNETT B., RATNOFF O.D. : Detection of the carrier state for classic hemophilia. <i>N. Engl. J. Med.</i> , 1973, <u>7</u> , 432.	662	133
BERGLUND G. : Studies of the inhibitory activity of specific antisera to some clotting factors in human plasma. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1962, <u>8</u> , 204.	274	41
BERGLUND G. : Immunological studies of haemophilic plasma. <i>Int. Arch. Allergy</i> , 1963, <u>22</u> , 1.	278	41
BIDWELL E., DIKE G.W., DENSON D.W. : Experiments with factor VIII separated from fibrinogen by electrophoresis in free buffer film. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1966, <u>12</u> , 583.	223	30
BIGGS R. : The absorption of human factor VIII neutralizing antibody by factor VIII. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1974, <u>26</u> , 259-267.	515 538 600	84 85 95
BIGGS R., AUSTEN D.E.G., DENSON K.W.E., RIZZA C.R., BORRETT R. : The mode of action of antibodies which destroy factor VIII. I. Antibodies which have second order concentration graphs. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1972, <u>23</u> , 125-135.	277 530	41 85
BIGGS R., AUSTEN D.E.G., DENSON K.W.E., RIZZA C.R., BORRETT R. : The mode of action of antibodies which destroy factor VIII. II. Antibodies which give complex concentration graphs. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1972, <u>23</u> , 137-155.	531	86
BIGGS R., BIDWELL E. : A method for the study of antihaemophilic globulin inhibitors with reference to six cases. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1959, <u>5</u> , 379.	529	85
BIGGS R.P., EVELING J., RICHARDS G. : The assay of antihaemophilic globulin activity. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1955, <u>1</u> , 20.	583	94
BLATT P.M., BRINKHOUS K.M., CULP H.R., KRAUSS J.S. and ROBERTS H.R. : Antihemophilic factor concentrate therapy in von Willebrand disease. Dissociation of bleeding-time factor and ristocetin-cofactor activities. <i>J. Amer. Med. Assn.</i> , 1976, <u>236</u> , 2770.	105	18
BLECHER T.E., WESTBY J.C., THOMPSON M.J. : Synthesis of procoagulant antihemophilic factor in vitro. <i>Lancet</i> , 1978, <u>1</u> , 1333-1336.	480	79

	REF.	PAGE
BOUMA B.N., DODDS W.J., Van MOURIK J.A., SIXMA J.J., WEBSTER W.P.: Infusion of human and canine factor VIII in dogs with von Willebrand' disease : studies of the von Willebrand and Factor VIII synthesis stimulating factors. <i>Scand. J. Haematol.</i> , 1976, <u>17</u> , 263-265.	134 178 704	21 26 162
BOUMA B.N., SIXMA J.J., de GRAAF S., WIEGERINCK Y., Van MOURIK J.A., MOCHTAR I.A. : Factor VIII antigen and platelet retention in a glass bead column. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1973, <u>25</u> , 645-656.	552 646	89 114
BOUMA B.N., WIEGERINCK Y., SIXMA J.J., Van MOURIK J.A., MOCHTAR I.A. : Immunochemical characterization of purified anti-haemophilic factor A which corrects abnormal platelet retention in vWd. <i>Nature New Biol.</i> , 1972, <u>236</u> , 104-106.	285 319	43 49
BOWIE E.J.W., FUSTER V., OWEN C.A., BROWN A.L. : Resistance to the development of spontaneous atherosclerosis in pigs with von Willebrand's disease. (abstract) <i>Thromb. Diathes. Haemorrh.</i> , 1975, <u>34</u> , 599.	406	66
BOWIE E.J.W., OWEN C.A. : The value of measuring platelet adhesiveness in the diagnosis of bleeding diseases. <i>Amer. J. Clin. Pathol.</i> , 1973, <u>60</u> , 302-308.	546' 650	88 123
BOWIE J.W., OWEN C.A. Jr, THOMPSON J.H. Jr, DIDISHEIM P. : Platelet adhesiveness in von Willebrand's disease. <i>Nature</i> , 1969, <u>257</u> , 510.	366	58
BOWIE E.J.W., OWEN C.A., ZOLLMAN P.E., THOMPSON J.H., FASS D.N.: Tests of hemostasis in swine : normal values and values in pigs affected with von Willebrand's disease. <i>Amer. J. Vet. Res.</i> , 1973, <u>34</u> , 1405-1407.	403	66
BRODY J.I., HAIDAR M.E., ROSSMAN R.E.. A hemorrhagic syndrome in Waldenström's macroglobulinemia secondary to immunoadsorption of factor VIII. <i>New. Engl. J. Med.</i> , 1970, <u>300</u> , 408-410.	696	152
BROZOVIC M. : Physiological mechanisms in coagulation and fibrinolysis. <i>Brit. Med. Bull.</i> , 1977, <u>33</u> , n°3 : haemostasis.	311	48
CAEN J.P., LEVY-TOLEDANO S. : Interaction between platelets and von Willebrand factor provides a new sheme for primary haemostasis. <i>Nature New Biol.</i> , 1973, <u>244</u> , 159-161.	55	13 et 14
CASILLAS G., SIMONETTI C., PAVLOVSKY A. : Molecular sieving experiments on human factor VIII. <i>Coagulation</i> , 1970, <u>3</u> , 123-127.	119 156	20 23
CASILLAS G., SIMONETTI C., VASQUEZ C., PAVLOVSKY A. : Physical and immunological studies on bovine factor VIII. <i>Haemostasis</i> , 1976, <u>5</u> , 1-13.	238	32
CASTALDI P.A., PENNY R. : A macroglobulin with inhibitory activity against coagulation factor VIII. <i>Blood</i> , 1970, <u>35</u> , 370-376.	558	89
CASTILLO R., MARAGALL S., RODES J., CLEMENTE C., PROFITOS J., ORDINAS A. : Increased factor VIII complex and defective ristocetin induced platelet aggregation in liver disease. <i>Thromb. Res.</i> , 1977, <u>11</u> , 899 - 906	474	78

	REF.	PAGE
CEJKA J. : Enzyme immunoassay for factor VIII-related antigen. Clin. Chem., 1982, <u>28</u> , 1356-1358.	677'	144
CHANTARANGKUL V., INGRAM G.I.C., DARBY S. : An artificial "haemophilic" plasma for one-stage factor VIII assay. Thromb. Haemost., 1977, <u>38</u> , 344.	590	95
CLOUGH V., Mac FARLANE I.A., O'CONNOR J., WOOD J.K.: Acquired Willebrand's syndrome and Ehlers-Danlos syndrome presenting with gastro-intestinal bleeding. Scand. J. Haematol., 1979, <u>22</u> , 305-310.	690'	151
COCKBURN C.G., De BEAUFRE-APPS R.J., WILSON J., HARDISTY R.M. : Parallel destruction of F VIII procoagulant activity and an 85.000 dalton protein in highly purified factor VIII/vWf. Thromb. Res., 1981, <u>21</u> , 295-309.	33 506	11 82
COHN E.J., STRONG L.E., HUGHES W.L., MULFORD D.J., ASWORTH J.N., MELIN M., TAYLOR H.L. : Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of proteins and lipoprotein components of biological tissues and fluids. J. Amer. Chem. Soc., 1946, <u>68</u> , 459-475.	93	17
COLLER B.S. : The effects of ristocetin and von WF on platelet electrophoretic mobility. J. Clin. Invest., 1978, <u>61</u> , 1168-1175.	77	15
COLLER B.S., GRALNICK H. : Studies on the mechanism of ristocetin induced platelet agglutination. Effects of structural modification of ristocetin and vancomycin. J. Clin. Invest., 1977, <u>60</u> , 302-312.	78	15
COOPER H.A., CLEMETSON K.J., LUSCHER E.F. : Human platelet membrane receptor for bovine von Willebrand factor (platelet aggregating factor) : an integral membrane glycoprotein. Proc. Nat. Acad. Sci. Us-Biol. Sci., 1979, <u>76</u> , 1069.	88	16
COOPER H.A., GRIGGS T.R., WAGNER R.H. : Factor VIII recombination after dissociation by CaCl ₂ . Proc. Nat. Acad. Sci. Us-Biol. Sci., 1973, <u>70</u> , 2326-2329.	206	28
COOPER H.A., REISNER F.F., HALL M., WAGNER R.H. : Effects of thrombin treatment on preparations of factor VIII on the Ca ²⁺ -dissociated small active fragment. J. Clin. Invest., 1975, <u>56</u> , 751-760.	329	49
COUNTS R.B. : Solid phase immunoradiometric assay of factor VIII protein. Brit. J. Haematol., 1975, <u>31</u> , 429-436.	360	57
COUNTS R.B., PASKELL S.L., ELGEE S.K. : Disulfide bonds and the quaternary structure of factor VIII/von Willebrand factor. J. Clin. Invest., 1978, <u>62</u> , 702-709.	146 185 199 413 633	22 26 27 68 99
CRANE L.J. : Kinetic latex agglutimetry - II : a rapid quantitative assay for factor VIII antigen. Clin. Chem., 1981, <u>27</u> , 697-700.	363	57
Mc CUE M.J., BROSSOIT A.D., MARMER D.J. and HEAD D.R. : Von Willebrand factor (VIII/vWf) in lyophilized factor VIII concentrates. Amer. J. Haematol., 1980, <u>9</u> , 39-42.	104	18

	REF.	PAGE
DENSON K.W., BIGGS E.R., HADDON M.D., BARRETT R., COBB K. : Two types of hemophilia (A+ and A-) : a study of 48 cases. Brit. J. Haematol., 1969, <u>17</u> , 163-171.	537 598	86 95
DESAI R.G., CHOTO R.G., INAMI K., LAVON R., ANTOINE J., TERASAKI P. : Spleen infusion in the treatment of hemophilia and allied disorders. Clin. Res., 1969, <u>17</u> , 115.	489	79
Van DIEIJEN G., TANS G., ROSING J. and HEMKER H.C. : The role of phospholipid and factor VIIa in the activation of bovine factor X. J. Biol. Chem., 1981, <u>256</u> , 3433-3442.	23	9 et 11
DODDS W.J., HOYER L.W. : Coagulation activities in perfused organs- Regulation by addition of animal plasma. Brit. J. Haematol., 1974 <u>26</u> , 497-509.	490	79
DODDS W.J., RAYMOND S.L., MOYNIHAN A.C., FENTON J.W. : Independent stimulators regulating the production of factors VIII and IX in perfused spleens. J. Lab. Clin. Med., 1972 <u>79</u> , 770-777.	491	79
DOUCET-DE-BRUINE M.H., SIXMA J.J., OVER J., BEESER-VISSER N.H. : Heterogeneity of human factor VIII -II- Characterization of forms of factor VIII binding to platelets in the presence of ristocetin. J. Lab. Clin. Med., 1978, <u>92</u> , 96-107.	80 415	16 68
DURAN-SUAREZ J.R. : Incidence of circulating anticoagulants in a normal population. Acta Haematol., 1982, <u>67</u> , 217-219.	528	85
DURAN-SUAREZ J.R., PICO M., ZUAZU J., CORTES M., MONASTERIO J., TRIGINER J. : Acquired von Willebrand's disease caused by a chronic granulocytic leukaemia. Brit. J. Haematol., 1981, 173-175.	699	152
DURAN-SUAREZ J.R., PIGRAU-SERRALLACH C., BOSCH-GIL J.A., TRIGINER-BOIXEDA J. : Acquired haemophilia. Lancet, 1981, i, 723.	527	85
EGBERG N., BLOMBACK M. : On the characterization of acquired inhibitors to ristocetin induced platelet aggregation found in patients with von Willebrand's disease. Thromb. Res., 1976, <u>9</u> , 527-531.	342	55
ELODI S., VARADI K. : Optimization of conditions for the catalytic effect of the factor IXa-factor VIII complex - probable role of the complex in the amplification of blood coagulation. Thromb. Res., 1979, <u>15</u> , 617-630.	28	11
ELODI S., VARADI K., VOROS E. : Kinetics of formation of factor IXa-factor VIII complex on the surface of platelets. Thromb. Res., 1981, <u>21</u> , 695-700.	29	11
EVANS R.J., AUSTEN D.E.G. : Assay of ristocetin cofactor using fixed platelets and a platelet counting technique. Brit. J. Haematol., 1977, <u>37</u> , 289-294.	379 387	59 60
FASS D.N., KNUTSON J., BOWIE J.W. : Porcine Willebrand factor : a population of multimers. J. Lab. Clin. Med., 1978, <u>91</u> , 307-320.	214 336	29 51

	REF.	PAGE
FASS D.N., KNUTSON G.J., KATZMANN J.A. : Monoclonal antibodies to porcine factor VIII coagulant and their use in the isolation of active coagulant proteins. <i>Blood.</i> , 1982, <u>59</u> , 594-600.	571	91
FEINSTEIN D.I., RAPAPORT S.I. : Acquired inhibitors of blood coagulation. In : "Progress in hemostasis and thrombosis". Ed. T.H. Spaet, 1972, <u>1</u> , 85.	525	85
FIRKIN B.G., HOWARD M.A. : On von Willebrand disease (vWd). <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1976, <u>32</u> , 151-158.	397	62
FISHMAN D.J., JONES P.K., MENITOVE J.E., RATNOFF O.D., EVERSON B. Detection of the carrier state for classic hemophilia using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). <i>Blood</i> , 1982, <u>59</u> , 1163-1168.	354 670 677	56 134 144
FLOYD M., BURNS W., GREEN D. : On the interaction between Ristocetin and Ristocetin cofactor (RCOF). <i>Thromb. Res.</i> , 1977, <u>10</u> , 841-850.	74	15
FROMMEL D., ALLAIN J.P. : Genetic predisposition to develop factor VIII antibody in classic hemophilia. <i>Clin. Immunol. Immunopathol.</i> , 1977, <u>8</u> , 34-38.	520	84
FROMMEL D., ALLAIN J.P., SAINT-PAUL E. <u>et al.</u> : HLA antigens and factor VIII antibody in classic hemophilia. European study group of factor VIII antibody. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1981, <u>46</u> , 687-689.	523	84
FROMMEL D., MULLER J.Y., PROU-WARTELLE O., ALLAIN J.P. : Possible linkage between the major histocompatibility complex and the immune response to factor VIII in classic haemophilia. <i>Vox. Sang.</i> , 1977, <u>33</u> , 270-272.	521	84
FUJIMOTO T., OHARA S., HAWIGER J. : Thrombin - induced exposure and prostacyclin inhibition of the receptor for factor VIII/von Willebrand factor on human platelets. <i>J. Clin. Invest.</i> , 1982, <u>69</u> , 1212-1222.	92	16
FUKUI H., MIKAMI S., OKUDA T., MURASHIMA N., TAKASE T., YOSHIOKA A. : Studies of von Willebrand factor - Effects of different kinds of carbohydrate oxidases, SH inhibitors, and some other chemical agents. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1977, <u>36</u> , 259-270.	436	73
FULCHER C.A., ZIMMERMAN T.S. : Characterization of the human factor VIII procoagulant proteins with a heterologous precipitating antibody. <i>Proc. Nat. Acad. Sci. US-Biol. Sci.</i> , 1982, <u>79</u> , 1648-1652.	510 579	82 92
FURLAN M., BECK E.A. : Strukturmodell von Faktor-VIII-komplex. <i>Schweiz. Med. Wschr.</i> , 1976, <u>106</u> , 1378.	200	27
FURLAN M., FELIX R., BECK E.A. : Preparation of factor VIII deficient plasma by immunoadsorption. <i>Vox Sang.</i> , 1979, <u>36</u> , 342-346.	591	95
FURLAN M., JAKAB T., BECK E.A. : Dissociation of human factor VIII by rhizopus lipase. <i>Thromb. Res.</i> , 1977, <u>10</u> , 431-443.	172 179	25 26
FURLAN M., JAKAB T., BECK E.A. : Effects of amidination and chemical cross-linking on human factor VIII. <i>Biochem. Biophys. Acta</i> , 1977, <u>494</u> , 319-325.	635	100

	REF.	PAGE
FURLAN M., PERRET B.A., BECK E.A. : Studies on factor VIII - related protein. IV - Interaction of galactose - specific lectins with human factor VIII/von Willebrand factor. <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> , 1980, <u>623</u> , 402-411.	453	74
FURLAN M., PERRET B.A., BECK E.A. : Von Willebrand activity of low molecular weight human factor VIII increases by binding to gold granules. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1981, <u>45</u> , 242-246.	82	16
FUSTER V., BOWIE E.J.W., JOSA M., KAYE M.P., FASS D.N. : Artherosclerosis in normal and von Willebrand pigs-Cross-aortic transplantation studies. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1979, <u>42</u> , 425.	407	66
FUSTER V., BOWIE E.J.W., LEWIS J.C., FASS D.W., OWEN C.A., BROWN A.L. : Resistance to arteriosclerosis in pigs with von Willebrand's disease. Spontaneous and high-cholestered diet-induced arteriosclerosis. <i>J. Clin. Invest.</i> , 1978, <u>61</u> , 722-730.	404	66
FUSTER V., DEWANJEE M.K., KAYE M.P., FASS D.W., BOWIE E.J.W. : Evaluation of platelet deposition following selective endothelial injury of the carotid artery in normal and von Willebrand pigs. <i>Circulation</i> , 1980, <u>62</u> , 98.	42 405	13 66
GAN T.E., SAWERS R.J., KOUTTS J. : Pathogenesis of antibody - induced, acquired von Willebrand syndrome. <i>Amer J. Hematol.</i> , 1980, <u>9</u> , 363-371.	698	152
GARDIKAS C., BAKALLOUDIS P., HATZIONNOU J., KOKKINOS D. The factor VIII concentration of the hepatic venous blood. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1965, <u>11</u> , 380-381.	464	78
GAZENGEL C., PRIEUR A.M., JACQUES C., BURIÖT D., NEDELLEC J., JOSSO F. : Antibody-induced von Willebrand syndrome : inhibition of VIII vWf and VIII Ag with sparing of VIII AHF auto-antibody. <i>Amer. J. Hematol.</i> , 1978, <u>5</u> , 355-363.	344 690	54 151
GAWRYL M.S., HOYER L.W. : Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, VIII:C)-VI : Characterization of antigenic determinants using human antibodies. <i>Clin. Immunol. Immunopathol.</i> , 1982, <u>23</u> , 517-526.	546 659	87 125
GIDDINGS J.C., EVANS D.J., BLOOM A.L. : Quantitation of factor VIII related antigen using laser nephelometer. <i>Thromb. Res.</i> , 1979, <u>15</u> , 847-856.	362	57
GIRMA J.P., LAVERGNE J.M., MEYER D., LARRIEU M.J. : Immunoradiometric assay of factor VIII : coagulant antigen using four human antibodies. Study of 27 cases of haemophilia A. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1981, <u>47</u> , 269-282.	544 609 619	87 96 97
GIRMA J.P., PIETU G., LAVERGNE J.M., MEYER D., LARRIEU M.J. : Abnormal antigenic reactivity of factor VIII/von Willebrand factor subunit in variants of von Willebrand's disease. <i>J. Lab. Clin. Med.</i> , 1982, <u>99</u> , 481-494.	190 197	26 27
GIROLAMI A., PATRASSI G.M., DALBOANOW R. : Considerations on combined factor VII and factor VIII defect. <i>Acta Haematol.</i> , 1981, <u>65</u> , 140-141.	625	98

	REF.	PAGE
GIROLAMI A., VENTURELL I., CELLA G. : Combined hereditary deficiency of factors VII and VIII. A distinct coagulation disorder due to the "lack" of an autosomal gene controlling factor VII and VIII activation. <i>Acta Haematol.</i> , 1976, <u>55</u> , 181-191.	624	98
GOODALL A.H., RANLINGS E., HUTTON R., O'BRIEN D.P.O., ROTBLAT F., BUCKLEY P., JANOSSY G., TUDDENHAM E.G.D. : Monoclonal antibodies to human factor VIII related antigen, Congrès International d'Hématologie et de Transfusion Sanguine. Budapest, 1-7 Aout 1982.	263	39
GORMAN J.J., EKERT H. : Studies on the structure and subunit composition of human antihemophilic factor. <i>Thromb. Res.</i> , 1978, <u>12</u> , 341-352.	181	26
GOUAULT-HEILMANN M., DUMONT M.D., INTRATOR L., CHENAL C., LEJONC J.L. : Acquired von Willebrand's syndrome with Ig M inhibitor against von Willebrand's factor. <i>J. Clin. Pathol.</i> , 1979, <u>32</u> , 1030-1035.	695	152
GOUDEMAM M., FOUCAUT M., HUTIN A., PARQUET-GERNEZ A. : Les anticoagulants circulants anti-facteur VIII au cours de l'hémophilie A. <i>Nouv. Rev. Fr. Hematol.</i> , 1963, <u>3</u> , 703-722.	536 596	86 95
GOUDEMAM M., PARQUET-GERNEZ A., FECELLE A. : Hémophilie - Les variants des facteurs VIII et IX. Discussion. <i>Nouv. Rev. Fr. Hematol.</i> , 1970, <u>10</u> , 627-629.	599	95
GRAHAM J.B. : Genotype assignment (carrier detection) in the haemophilias. <i>Clin. Haematol.</i> , 1979, <u>8</u> , 115-145.	668	134
GRAHAM J.B., BARROW E.S., ROBERTS H.R., WEBSTER W.P., BLATT P.M., BUCHNAN P., CEDERBAUM A.I., ALLAIN J.P., BARRETT D.A., GRALNICK H.R. : Dominant inheritance of hemophilia A in three generations of women. <i>Blood</i> , 1975, <u>46</u> , 175-188.	622	98
GRALNICK H. : Factor VIII/von Willebrand factor protein : Galactose, a cryptic determinant of von Willebrand factor activity. <i>J. Clin. Invest.</i> , 1978, <u>62</u> , 496-500.	246 439, 448 631 717	33 et ³⁴ 73 99 209
GRALNICK H.R., COLLER B.S., SULTAN Y. : Carbohydrate deficiency of the factor VIII/von Willebrand factor protein in von Willebrand's disease variants. <i>Science</i> , 1976, <u>192</u> , 56-59.	422, 428	71
GRALNICK H.R., CREGGER M.C., WILLIAMS S.B. : Characterization of the defect of the factor VIII/von Willebrand factor protein in von Willebrand's disease. <i>Blood</i> , 1982, <u>59</u> , 542-548.	254 421 440 452 712 723	34 69 et ¹⁰ 73 74 208 209
GRALNICK H.R., JACKSON G.M., WILLIAMS S.B., CREGGER M.C. : Factor VIII/von Willebrand factor protein - sensitivity of periodic acid Schiff stain to carbohydrate deficiency. <i>Blood</i> , 1982, <u>59</u> , 1310-1316.	255 429 454 707 723	34 71 74 207 209
GRALNICK H.R., SULTAN Y., COLLER B. : Von Willebrand's disease. Combined qualitative and quantitative abnormalities. <i>N. Engl. J. Med.</i> , 1977, <u>296</u> , 1024-1030.	244 333 423, 426 715	33 et ³⁴ 50 71 209

	REF.	PAGE
GRALNICK H.R., WILLIAMS S.B., MORISATO D.K. : Effect of multimeric structure of the factor VIII/vWf protein on binding to platelets. Blood, 1981, <u>58</u> , 387-397.	81 147 189 202	16 22 26 27
Mc GRATH K.M., JOHNSON C.A., STUART J.J. : Acquired Von Willebrand disease associated with an inhibitor to factor VIII antigen and gastrointestinal telangiectasia. Amer. J. Med., 1979, <u>67</u> , 693-696.	694	152
GREEN D. : Spontaneous inhibitors of factor VIII. Brit. J. Haematol., 1968, <u>15</u> , 57.	524	85
GREEN D. : A simple method for the purification of factor VIII (antihemophilic factor) employing snake venom. J. Lab. Clin. Med., 1971, <u>77</u> , 153-158.	257	35
GREEN D., LECHNER K. : A survey of 215 non hemophilic patients with inhibitors to factor VIII. Thromb. Haemost., 1981, <u>45</u> , 200-203.	526	85
GREEN D., MULLER H.P. : Platelet binding of the von Willebrand factor. Thromb. Haemost., 1978, <u>39</u> , 689-694.	65	15
GREEN D., POTTER E.V. : Platelet bound ristocetin aggregation factor in normal subjects and patients with von Willebrand's disease. J. Lab. Clin. Med., 1976, <u>87</u> , 976-986.	64	15
GREEN A.J., RATNOFF O.D. : Elevated antihemophilic procoagulant activity and AHF - like antigen in alcoholic cirrhosis of the liver. J. Lab. Clin. Med., 1974, <u>83</u> , 189-197.	475	78
GRIGGS T.R., REDDICK R.L., SULTZER D., BRINKHOUS K.M. : Susceptibility to atherosclerosis in aortas and coronary arteries of swine with von Willebrand's disease. Amer. J. Pathol., 1981, <u>102</u> , 137-145.	409	66
GROTH C.G., HATHAWAY W.E., GUSTAFSSON A., GEIS W.P., PUTNAM C.W., BJORKEN C., PORTER K.A., STARZL T.E. : Correction of coagulation in the hemophilic dog by transplantation of lymphatic tissue. Surgery, 1974, <u>75</u> , 725-733.	488	79
GUDE N.M., KOUTTS J., BRODIE G.N., FIRKIN B.G. : A rabbit antibody directed against von Willebrand's factor (abstract). Proc. Aust. Soc. Med. Res., 1973, <u>3</u> , 133.	267	40
HANDIN R.I., MARTIN V., MOLONEY W.C. Antibody-induced von Willebrand's disease : a newly defined inhibitor syndrome. Blood, 1976, <u>48</u> , 393-406.	345 685	55 151
HANSEN J.L., BARLOW P.L., DAVIS G.L. : An improved enzyme immunoassay for factor VIII - related antigen. Clin. Chem., 1981, <u>27</u> , 1107.	676	144
HARRIS R.B., NEWMAN J., JOHNSON A.J. : Partial purification of biologically active, low molecular weight, human antihemophilic factor free of von Willebrand factor. I-Partial characterization and evidence of disulfide bond (s) susceptible to limited reduction. Biochim. Biophys. Acta, 1981, <u>668</u> , 456-470.	505	82
HELLINGS J.A., Van LEEUWEN F.R., OVER J., Van MOURIK J.A. : Immunoradiometric assay of VIII:CAg, a potential tool to detect human anti-VIII:C antibodies. Thromb. Res., 1982, <u>26</u> , 297-302.	547	87

	REF.	PAGE
HEMKER H.C., KAHN M.J., DEVILEE P.P. : The adsorption of coagulation factors onto phospholipids. <i>Thromb. Diath. Haemorrh.</i> , 1970, <u>24</u> , 214-223.	642	100
HERSHGOLD E.J. : Factor VIII. <i>Ann. NY Acad. Sci.</i> , 1975, <u>240</u> , 70-73.	125 131 152	20 21 22
HERSHGOLD E.J., DAVISON A.M., JANSZEN M.E. : Isolation and some chemical properties of human factor VIII (antihemophilic factor). <i>J. Lab. Clin. Med.</i> , 1971, <u>77</u> , 185-205.	110 121 129,138 221 226 231, 237 240 702	19 20 21 29 30 31 et 32 33 161
HERSHGOLD E.J., DAVISON A.M., JANSZEN M.E. : Human factor VIII (antihemophilic factor) : Activation and inactivation by phospholipases. <i>J. Lab. Clin. Med.</i> , 1971, <u>77</u> , 206-218.	256 641	35 100
HERSHGOLD E.J., POOL J.G., PAPPENHAGEN A.R. : The potent antihemophilic globuline concentrate derived from a cold-insoluble fraction of human plasma. <i>J. Lab. Med.</i> , 1966, <u>67</u> , 23-32.	100'	18
HERSHGOLD E.J., SILVERMAN L., DAVISON A.M., JANSZEN M. : Native and purified factor VIII : molecular and electron microscopical properties and a comparison with hemophilic plasma. (abstract). <i>Fed. Proc.</i> 1967, <u>26</u> , 488.	124 127 235	20 21 31
HERSHGOLD E.J., SPRAWLS S. : Molecular properties of purified human, bovine and porcine antihemophilic globulins (AHG) (abstract). <i>Fed. Proc.</i> 1966, <u>25</u> , 317.	224	30
HOLMBERG L., BORGE L., LJUNG R., NILSSON I.M. : Measurement of antihemophilic factor A antigen (VIII:CAg) with a solid phase immunoradiometric method based on homologous non-haemophilic antibodies. <i>Scand. J. Haematol.</i> , 1979, <u>23</u> , 17-24.	542 605 616	87 96 97
HOLMBERG L., JEPSON J.O., NILSSON I.M., STENFLO J. : Cyanogen bromide and tryptic fragments of normal and haemophilic factor VIII. <i>Thromb. Res.</i> , 1975, <u>6</u> , 523-532.	233 334	31 et 32 50
HOLMBERG L., MANNUCCI P.M., TURESSON I., RUGGERI Z.M., NILSSON I.M. Factor VIII antigen in the vessel wall in von Willebrand's disease and hemophilia A. <i>Scand. J. Haematol.</i> , 1974, <u>13</u> , 33-38.	294	45
HOLMBERG L., NILSSON I.M. : Genetic variants of von Willebrand's disease. <i>Brit. Med. J.</i> , 1972, <u>3</u> , 317-320.	284	42
HOPFF F. Ueber die haemophilic oder die erbliche anlage zu tödtlichen blutungen. (Thesis) Würzburg, 1828, 17.	2	3
HOROWITZ B., LIPPIN A., WOODS K.R. : Purification of low molecular weight factor VIII by affinity chromatography using factor VIII-Sepharose. <i>Thromb. Res.</i> , 1979, <u>14</u> , 463-475.	499	82
HOUGIE C., SARGEANT R.B., BROWN J.E., BAUGH R.F. : Evidence that factor VIII and Ristocetin aggregating factor (VIII Rist.) are separate molecular entities. <i>Proc. Soc. Exp. Biol. Med.</i> , 1974, <u>147</u> , 58-61.	268	40

	REF.	PAGE
HOUGIE C. : Synthesis of procoagulant antihemophilic factor in vitro. <i>Lancet</i> , 1978, <u>8089</u> , 574.	478	79
HOUGIE C., DENSON K.W.E. and BIGGS R. : A study of the reaction product of factor VIII and factor IX by gel filtration. <i>Thromb. Diath. Haemorrh.</i> 1967, <u>18</u> , 211.	20	9
HOUGIE C., SARGEANT R.B. : Antigen/biological activity ratio for factor VIII. <i>Lancet</i> , 1973, <u>7814</u> , 1247-1248.	551 655	89 123
HOWARD M.A., FIRKIN B.G. : Ristocetin - a new tool in the investigation of platelet aggregation. <i>Thromb. Diath. Haemorrh.</i> , 1971, <u>26</u> , 362-369.	61 368	14, 15 58
HOWARD M.A., HAU L., PERKIN J., THOMAS K.B., FIRKIN B.G., KOUTTS J. : Causes for the discrepancies in the measurements of factor VIII antigen. <i>Thromb. Res.</i> , 1980, <u>19</u> , 63-72.	349	56
HOWARD M.A., HENDRIX L., FIRKIN B.G. : Further studies on the factor VIII of a patient with a variant form of von Willebrand's disease. <i>Thromb. Res.</i> , 1979, <u>14</u> , 609-619.	432	73
HOWARD M.A., HENDRIX L.E., THOMAS K.B., FIRKIN B.G., WHITWORTH J.A. : The kidney not the sole site of factor VIII synthesis. <i>Thromb. Res.</i> , 1979, <u>15</u> , 587-588.	494	80
HOWARD M.A., PERKIN J., KOUTTS J., FIRKIN B.G. : Quantitation of binding of factor VIII antigen to Concanavalline A. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1981, <u>47</u> , 607-615.	433	73
HOWARD M.A., SAWERS R.J., FIRKIN B.G. : Ristocetin - a mean of differentiating von Willebrand's disease into two groups. <i>Blood</i> , 1973, <u>41</u> , 687-690.	369	58
HOYER L.W. : Von Willebrand's disease, In : "Progress in Hemostasis and Thrombosis", ed. SPAET H., New-York, 1976, <u>3</u> , 231-287.	389 393, 396 459	61 62 77
HOYER L.W. : Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, Factor VIII). III. Comparative binding properties of human and rabbit anti-AHF. <i>Blood</i> , 1972, <u>39</u> , 481-489.	535	86
HOYER L.W. : Immunological studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII)-VI-Radioimmunoassay of AHF antigen. <i>J. Lab. Clin. Med.</i> , 1972, <u>80</u> , 822-833.	359	57
HOYER L.W. : Pseudo-von Willebrand's disease. <i>N. Engl. J. Med.</i> , 1982, <u>306</u> , 360-362.	401	65
HOYER L.W. : The nature and reactions of procoagulant factor VIII. <i>Congres ISHT/ISBT Budapest, Aout 1982.</i>	503	82
HOYER L.W., BRECKENRIDGE R.T. : Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII) : cross-reacting material in a genetic variant of haemophilia A. <i>Blood</i> , 1969, <u>32</u> , 962-971.	597	95
HOYER L.W., DE LOS SANTOS R.P., HOYER J.R. : Antihemophilic factor antigen. Localization in endothelial cells by immunofluorescent microscopy. <i>J. Clin. Invest.</i> , 1973, <u>52</u> , 2737-2744.	292	45

	REF.	PAGE
HOYER L.W., SHAINOFF J.R. : Factor VIII-related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers. <i>Blood</i> , 1980, <u>55</u> , 1056-1059.	151 164	22 24
HOYER L.W., TRABOLD N.C. : The effect of thrombin on human factor VIII. Cleavage of the factor VIII protein during activation. <i>J. Lab. Clin. Med.</i> 1981, <u>97</u> , 50-64.	34 502	11- 82
HULTIN M.B. : Role of human factor VIII in factor X activation. <i>J. Clin. Invest.</i> , 1982, <u>69</u> , 950-958.	36	11
HULTIN M.B., LONDON F.S., SHAPIRO S.S., YOUNT W.Y. : Heterogeneity of factor VIII antibodies. Further immunochemical and biologic studies. <i>Blood</i> , 1977, <u>49</u> , 807-818.	568	90
HULTIN M.B., NEMERSON Y. : Activation of factor X by factors IXa and VIII, a specific assay for factor IXa in the presence of thrombin-activated factor VIII. <i>Blood</i> , 1978, <u>52</u> , 928-940.	24	9 et 11
INGRAM G.I., KINGSTON P.S., LESLIE J., BOWIE E.J. Four cases of acquired von Willebrand's syndrome. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1971, <u>21</u> , 189-199.	680	150
JAFFE E.A.: Endothelial cells and the biology of factor VIII. <i>N. Engl. J. Med.</i> , 1977, <u>296</u> , 377-382.	304	46 et 47
JAFFE E.A., HOYER L.W., NACHMAN R.L. : Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. <i>J. Clin. Invest.</i> , 1973, <u>52</u> , 2757-2764.	301	46
JAFFE E.A., HOYER L.W., NACHMAN R.L. : Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. <i>Proc. Nat. Acad. Sci. US-Biol. Sci.</i> , 1974, <u>71</u> , 1966-1969.	302	46
JAFFE E.A., NACHMAN R.L. : Subunit structure of factor VIII antigen synthesized by cultured human endothelial cells. <i>J. Clin. Invest.</i> , 1975, <u>56</u> , 698.	303	46
JENKINS C.S., MEYER D., DREYFUS M.D., LARRIEU M.J. : Willebrand factor and Ristocetin 1. Mechanism of ristocetin-induced platelet aggregation. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1974, <u>28</u> , 561-578.	68 377	15 59
JENKINS C.S.P., MEYER D., LARRIEU M.J. : Interaction of ristocetin and von Willebrand factor. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1976, <u>35</u> , 752.	69	15
JENKINS C.S.P., PHILLIPS D.R., CLEMETSON K.J., MEYER D., LARRIEU M.J., LUSCHER E.F. : Platelet membrane glycoproteins implicated in ristocetin-induced aggregation. Studies of the proteins on platelets from patients with Bernard-Soulier syndrome and von Willebrand's disease. <i>J. Clin. Invest.</i> , 1976, <u>57</u> , 112-124.	87	16
JOHNSON A.J., NEWMAN J., HOWELL M.B., PUSZKIN S. : Purification of antihemophilic factor (AHF) for clinical and experimental use. <i>Thromb. Diath. Haemorrh.</i> , 1967, <u>26</u> , 377-381.	116 126 220	20 21 29
JOHNSON A.J., NEWMAN J.J., KARPATKIN M.H., PUSZKIN S. : Preparation of high purity AHF with polyethylene glycol. In : <i>Hemophilia and New Hemorrhagic States</i> , ed. by M. BRINKHOUS, 1970, 67-71.	99	18

	REF.	PAGE
JOIST J.H., COWAN J.F., ZIMMERMAN T.S. : Acquired von Willebrand's disease. N. Engl. J. Med., 1978, suppl. 7, 988-991.	689	151
JONES J.H., RIZZA C.R., HARDISTY R.M. DORMANDY C., Mac PHERSON C.: Combined deficiency of factor V and factor VIII (antihæmophilic globulin). A report of three cases. Birt. J. Haematol., 1962, <u>8</u> , 120-128.	626	98
JONES T.R., KAO K.J., PIZZO S.V., BIGNER D.D. : Endothelial cell surface expression and binding of factor VIII/von Willebrand factor. Amer. J. Pathol., 1981, <u>103</u> , 304-308.	300	45
JOSHUA D.E., EXNER T., HOLMES D., RICKARD K.A., KRONENBERG H. : Antibodies to human factor VIII complex from BALB/C mice. Thromb. Res., 1981, <u>22</u> , 345-352.	265	40
JÜRGENS R., LEHMANN W., WEGELIUS O. <u>et al.</u> Mitteilung über den Mangel an antihämophilem globulin (factor VIII) bei der Aalandischen Thrombopathie (v. Willebrand-Jürgens). Thromb. Diath. Haemorrh., 1957, <u>1</u> , 257-260.	15	4
KAELIN A.C. : Sodium periodate modification of factor VIII procoagulant activity. Brit. J. Haematol., 1975, <u>31</u> , 349-359.	324 630	49 99
KANG E.P., CRUICKSHANK N.H., ROCK G. : Visualisation of LMW F VIII in the presence of benzamide. Thromb. Res., 1980, <u>17</u> , 337-346.	504	82
KAO K.J., PIZZO S.V., Mc KEE P.A. : Demonstration and characterization of specific binding sites for factor VIII/vWF on human platelets. J. Clin. Invest., 1979, <u>63</u> , 656-664.	58 367	14 et 15 58
KAO K.J., PIZZO S.V., Mc KEE P.A. : A radioreceptor assay for quantitating plasma factor VIII/von Willebrand's protein. Blood, 1981, <u>57</u> , 579-585.	66 et 79'	15
KAO K.J., PIZZO S.V., Mc KEE P.A. : Factor VIII/von Willebrand protein. Modification of its carbohydrate causes reduced binding to platelets. J. Biol. Chem., 1980, <u>255</u> , 10134-10139.	251 443 450 710 720	34 73 74 et 75 208 209
KASS L., RATNOFF O.D., LEON M.A. : Studies on the purification of antihemophilic factor (factor VIII). I. Precipitation of antihemophilic factor by concanavalin A. J. Clin. Invest., 1969, <u>48</u> , 351-358.	236	31
KAVANAH M.L., WOOD C.N., DAVIDSON J.F. : The immunological characterization of human antibodies to factor VIII isolated by immuno-affinity chromatography. Thromb. Haemost., 1981, <u>45</u> , 60-64.	562	90
Mc KEE P.A. : Purification and electrophoretic analysis of human antihemophilic factor (factor VIII), (abstract). Fed. Proc., 1970, <u>29</u> , 647.	120 157 169 173 239	20 23 25 26 33
Mc KEE P.A., ANDERSEN J.C., SWITZER M.E. : Molecular studies of human factor VIII. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1975, <u>240</u> , 8-33.	207	28
Mc KELVEY E.M., KWAAN H.C. : An Ig M circulating anticoagulant with factor VIII inhibitory activity. Ann. intern. Med., 1972, <u>77</u> , 571-575.	559	89

	REF.	PAGE
KEMBALL-COOK G., FURLONG R.A., PEAKE I.R., BARROWCLIFFE T.W. : Aluminium hydroxide absorption of factor VIII procoagulant antigen from plasma and factor VIII concentrate. <i>Thromb. Res.</i> , 1981, <u>23</u> , 193-196.	594	95
KERNOFF P.B. : The relevance of factor VIII inactivation characteristics in the treatment of patients with antibodies directed against factor VIII. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1972, <u>22</u> , 735-742.	532	86
KERNOFF P.B.A., RIZZA C.R. : The specificity of antibodies to factor VIII produced in the rabbit after immunization with human cryoprecipitate. <i>Thromb. Diath. Haemorrh.</i> , 1973, <u>29</u> , 652-660.	271	40 et 41
KERNOFF L.M., ROSE A.G., HUGHES J., JACOBS P. : Autopsy findings in an elderly man suffering from severe von Willebrand's disease. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1981, <u>46</u> , 714-716.	411	66
KIRBY E.P. : Factor VIII-associated platelet aggregation. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1977, <u>38</u> , 1054-1072.	71	15
KIRBY E.P., MILLS D.C.B. : The interaction of bovine factor VIII with human platelets. <i>J. Clin. Invest.</i> , 1975, <u>56</u> , 491-502.	376 434	59 73
KIRKWOOD T.B.L., BARROWCLIFFE T.W. : Discrepancy between one-stage and two-stage assay of factor VIII : C. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1978, <u>40</u> , 333-338.	586	93
KLEINMAN H.K., KLEBE R.J., MARTIN G.R. : Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. <i>J. Cell. Biol.</i> , 1981, <u>88</u> , 473-485.	48	13
KNUTSON G., FASS D.N. : Porcine factor VIII:C prepared by affinity reaction with von Willebrand factor and heterologous antibodies : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel analysis. <i>Blood</i> , 1982, <u>59</u> , 615-624.	509	82
KOUTTS J., HOWARD M.A., FIRKIN B.G. : Factor VIII physiology and pathology in man. In "Progress in Haematology", ed. BROWN E.B., 1979, <u>11</u> , 115-145.	371 402	58 65
KOUTTS J., LAVERGNE J.M., MEYER D. : Immunological evidence that human factor VIII is composed of two linked moieties. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1977, <u>37</u> , 415-428.	456 575	77 91
KOUTTS J., MEYER D., RICKARD K., STOTT L., FIRKIN B. : Heterogeneity in biological activity of human factor VIII antibodies. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1975, <u>29</u> , 99-107.	547'	88
KOUTTS J., STOTT L., FIRKIN B.G. : Actions of ristocetin on platelets. <i>Amer. J. Hematol.</i> , 1976, <u>1</u> , 313-317.	75	15
LAHAV J., HYNES R.O. : Involvement of fibronectin, von Willebrand factor and fibrinogen in platelet interaction with solid substrata. <i>J. Supramol. Str.</i> , 1981, <u>17</u> , 299-311.	91	16
LANE J.L., EKERT H., VAFIADIS A. : Affinity chromatography of human factor VIII using human and rabbit antibodies to factor VIII. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1979, <u>42</u> , 1306-1315.	186 193 555 658	26 27 89 124

	REF.	PAGE
LANGDELL R.D., WAGNER R.H., BRINKHOUS K.M. : Effect of antihemophilic factor on one stage clotting tests. J. Lab. Clin. Med., 1953, <u>41</u> , 637-647.	582	93
LARRIEU M.J., SOULIER J.P. : Deficit en facteur antihemophilique A, chez une fille, associé à un trouble du saignement. Rev. Hematol., 1953, <u>8</u> , 361-370.	10	4
LAVERGNE J.M., MEYER D., GIRMA J.P. LARRIEU M.J. : Precipitating anti-VIII : C antibodies in two patients with haemophilia A. Brit. J. Haematol., 1982, <u>50</u> , 135-146.	545	87
LAVERGNE J.M., MEYER D., KOUTTS J., LARRIEU M.J. : Isolation of human antibodies to factor VIII. Brit. J. Haematol., 1978, <u>40</u> , 631-641.	557	89
LAVERGNE J.M., MEYER D., REISNER H. : Characterization of human anti-factor VIII antibodies purified by immune complex formation. Blood, 1976, <u>48</u> , 931-939.	566	90
LAZARCHICK J., HOYER L.W. : Immunoradiometric measurement of the factor VIII procoagulant antigen. J. Clin. invest., 1978, <u>62</u> , 1048-1052.	540 603 614	87 96 97
LAZARCHICK J., HOYER L.W. : The properties of immune complexes formed by human antibodies to factor VIII. J. Clin. invest., 1977, <u>60</u> , 1070-1079.	556	89
LEGAZ M.E., SCHMER G., COUNTS R., DAVIE E. : Isolation and characterization of human Factor VIII (Antihemophilic factor). J. Biol. Chem., 1973, <u>248</u> , 3946-3955.	133 176 230 242 703 714	21 26 31 et 32 33 161 209
LEGRAND Y.J., FAUVEL F., GUTMAN N., MUH J.P., TOBELEM G., SOUIHON H., KARNIGUIAN A., CAEN J.P. : Microfibrils (MF) platelet interaction : requirement of von Willebrand factor. Thromb. Res., 1980, <u>19</u> , 737-739.	57	14
LEGRAND Y.J., RODRIGUEZ-REBALLOS A., KARTALIS G., FAUVEL F., CAEN J.P. : Adsorption of factor VIII antigen-activity complex by collagen. Thromb. Res., 1978, <u>13</u> , 909-911.	52 416	13 68
Mc LELLAN D.S., DEVLIN J.D., GROOM P., ARONSTAM A. : A radial immunodiffusion method for the assay of factor VIII:C antigen (VIII:CAg) in plasma. Brit. J. Haematol., 1981, <u>47</u> , 295-305.	612	96
LEONE G., POLA P., GUERRERA G., BIZZI B. : Acquired von Willebrand's syndrome during collagen disorder. Haematologica 1974, <u>59</u> , 212-220.	684	151
LIPTON R.A., POOL J.G. : Factor VIII. Lancet, 1973, <u>2</u> , 1261.	322	49
LJUNG R., HOLMBERG L. : F VIII:CAg in haemophilia A. A comparison between IRMA:s using haemophilic and spontaneous antibodies. Thromb. Res., 1981, <u>24</u> , 45-50.	611 621	96 97

	REF.	PAGE
LUDLAM C.A., PEAKE I.R., ALLEN I.V., DAVIES B.L., FURLONG R.A., BLOOM A.L. : Factor VIII and fibrinolytic response to D-deamino-8-D arginine vasopressine in normal subjects and dissociate response in some patients with haemophilia and von Willebrand's disease. Brit. J. Haematol., 1980, <u>45</u> , 499-511.	314	48
LUNDBLAD R.L., WEBSTER W.P., BRINKHOUS K.M. : The effect of dextrose on chromatography of antihemophilic factor (factor VIII). Thromb. Res., 1972, <u>1</u> , 197-200.	143	22
LUSHER J.M., SHUSTER J., EVANS R.K., POULIK M.D. : Antibody nature of an AHF (factor VIII) inhibitor. J. Pediat., 1968, <u>72</u> , 325-331.	560	90
MADARAS F., BELL W.R., CASTALDI P.A. : Isolation and insolubilization of human factor VIII by affinity chromatography. Haemostasis, 1978, <u>7</u> , 321-329.	115 260	19 38
MANDALAKI T., LOUIZOU C., DIMITRIADOU C., SYMEONIDIS P.M. : Variations in factor VIII during the menstrual cycle in normal woman. N. Engl. J. Med., 1980, <u>302</u> , 1093-1094.	664	133
MANNUCI P.M., ABERG M., NILSSON I.M., ROBERTSON B. : Mechanism of plasminogen activator and factor VIII increase after vasoactive drugs. Brit. J. Haematol., 1975, <u>30</u> , 81-93.	313	48
MANNUCCI P.M., MEYER D., RUGGERI Z.M., KOUTTS J., CIAVARELLA N., LAVERGNE J.M. : Precipitating antibodies in von Willebrand's disease. Nature, 1976, <u>262</u> , 141-142.	339	54
MANT M.J., HIRSH J., GAULDIE J., BIENENSTOCK J., PINEO G.F., LUKE K.H. : Von Willebrand's syndrome presenting as an acquired bleeding disorder in association with a monoclonal gammopathy. Blood, 1973, <u>42</u> , 429-436.	682	150
MARCHESI S.L., SHULMAN N.R., GRALNICK H.R. : Studies on the purification and characterization of human factor VIII. J. Clin. Invest., 1972, <u>51</u> , 2151-2161.	111 137 174 232 241 713	19 21 26 31 et 32 33 208
MARCHIORO T.L., HOUGIE C., RAGDE H., EPSTEIN R.B., THOMAS E.D. : Hemophilia - Role of organ homografts. Science, 1969, <u>163</u> , 188-190.	465	78
DE MARCO L., SHAPIRO S.S. : Properties of human asialo - factor VIII. A ristocetin - independent platelet - aggregating agent. J. Clin. Invest., 1981, <u>68</u> , 321-328.	253 424 437, 446 722	34 71 73 209
MARDER U.J., TRANQUI-POUIT L., HUDRY-CLERGEON G., ATICHARTAKARN V., SUSCILLON M. : Electron microscopic studies of the factor VIII-von Willebrand factor protein (abstract). Thromb. Haemost., 1977, <u>38</u> , 88.	153	22
MARLAR R.A., GRIFFIN J.H. : Deficiency of Protein C inhibitor in combined factor V/VIII deficiency disease. J. Clin. Invest., 1980, <u>66</u> , 1186-1189.	627	98

	REF.	PAGE
MARTIN S.E., MARDER V.J., FRANCIS C.W., BARLOW G.H. : Structural studies on the functional heterogeneity of von Willebrand protein polymers. <i>Blood</i> , 1981, <u>57</u> , 313-323.	149 418	22 68
MARTIN S.E., MARDER V.J., FRANCIS C.W., LOFTUS L.S., BARLOW G.H. : Enzymatic degradation of the factor VIII - Von Willebrand protein : A unique tryptic fragment with ristocetin cofactor activity. <i>Blood</i> , 1980, <u>55</u> , 848-858.	187 192	26 27
MELLO-PERISSE A.L., SORIA J., SORIA C., MESTER L. : Dissociation between human platelet agglomerating activity and factor VIII procoagulant activity of bovine plasma preparations by chemical treatment. II : effect of periodate oxidation. <i>Pathol. Biol.</i> , 1973, <u>21</u> , Supp. 63-65.	629	99
MERTENS K., BERTINA R.M. : Activation of human coagulation factor VIII by activated factor X, the common product of the intrinsic and the extrinsic pathway of blood coagulation. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1982, <u>47</u> , 96-100.	35	11
MEYER D., DREYFUS M.D., LARRIEU M.J. : Willebrand factor - immunological and biological study. <i>Pathol. Biol.</i> , 1973, <u>21</u> , Supp. 66-71.	287 647	43 114
MEYER D., FROMMEL D., LARRIEU M.J., ZIMMERMAN T.S. : Selective absence of large forms of factor VIII/Von Willebrand factor in acquired von Willebrand's syndrome. Response to transfusion. <i>Blood</i> , 1979, <u>54</u> , 600-606.	693	152
MEYER D., JENKINS C.S., DREYFUS M.D., FRESSINAUD E., LARRIEU M.J. : Willebrand factor and ristocetin - II - Relationship between Willebrand factor, Willebrand antigen and factor VIII activity. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1974, <u>28</u> , 579-589.	385 693	60 151
MEYER D., JENKINS C.S., DREYFUS M., LARRIEU M.J. : Experimental model for von Willebrand's disease. <i>Nature</i> , 1973, <u>243</u> , 293-294.	286 343 374	43 55 59
MEYER D., LARRIEU M.J. : Le facteur Willebrand - biologie et immunologie Communication 4ème réunion, Groupe Hémostase et Thrombose, Paris, Décembre 1972.	553	89
MEYER D., LARRIEU M.J., DREYFUS J.C. : Migration électrophorétique des facteurs de coagulation sur acétate de cellulose. <i>Nouv. Rev. Fr. Hematol.</i> , 1969, <u>9</u> , 611-629.	225	30
MEYER D., OBERT B., PIETU G., LAVERGNE J.M., ZIMMERMAN T.S. : Multimeric structure of factor VIII/von Willebrand factor in von Willebrand's disease. <i>J. Lab. Clin. Med.</i> , 1980, <u>95</u> , 590-602.	161 419	23 69
MEYER D., OBERT B., ZIMMERMAN T., EDGINGTON T. : Monoclonal antibodies specific for factor VIII from cellular hybrids (abstract). <i>Circulation</i> , 1980, <u>3</u> , 106	89 261	16 38
MITCHELL G.A., ABDULLAHAL C.M., RUIZ J.A., HUSEBY R.M., ALVAREZ D.E., GEIGER T.M., BLACK F.M., HELLER Z.H. : Fluorogenic substrate assays for factors VIII and IX - introduction of a new solid phase fluorescent detection method. <i>Thromb. Res.</i> , 1981, <u>21</u> , 573-584.	585	94

	REF.	PAGE
MDAKE J.L., OLSON J.D., TROLL J.H., TANG S.S., FUNICELLA T., PETERSON D.M. : Binding of radiolabelled human von Willebrand factor to Bernard Soulier thrombasthenic and von Willebrand's disease platelets. <i>Thromb. Res.</i> , 1980, <u>19</u> , 21-27.	63 84	15 16
MOAKE J.L., OLSON J.D., TROLL J.H., WEINGER R.S., PETERSON D.M., CIMO P.L. : Interaction of platelets von Willebrand factor and ristocetin during platelet agglutination. <i>J. Lab. Clin. Med.</i> , 1980, <u>96</u> , 168-184.	72	15
MONTGOMERY R.R., ZIMMERMAN T. : Von Willebrand's disease antigen II (a new plasma and platelet antigen deficient in severe von Willebrand's disease). <i>J. Clin. Invest.</i> , 1978, <u>61</u> , 1498-1507.	132	21
MORISATO D.K., GRALNICK H.R. : Selective binding of the F VIII/vwf protein to human platelets. <i>Blood</i> , 1980, <u>55</u> , 9-15.	59 59 252 438 451 711 721	14 15 34 73 74 208 209
Van MOURIK J.A., BOLHUIS P.A. : Dispersity of human factor VIII-von Willebrand factor. <i>Thromb. Res.</i> , 1978, <u>13</u> , 15-24.	141 183 191	21 26 27
Van MOURIK J.A., BOUMA B.N., LA BRUYERE W.T., DE GRAAF S., MOCHTAR I.A. : Factor VIII a series of homologous oligomers and a complex of two proteins. <i>Thromb. Res.</i> 1974, <u>4</u> , 155-164.	140 215 320	21 29 49
VAN MOURIK J.A., MOCHTAR I.A. : Purification of human antihemophilic factor (factor VIII) by gel chromatography. <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> , 1970, <u>221</u> , 677-679.	108	18
MUKAI K., ROSAI J., BURGDORF W.H.C. : Localization of factor VIII related antigen in vascular endothelial cells using an immunoperoxidase method. <i>Amer. J. Surg. Pathol.</i> , 1980, <u>4</u> , 273-276.	297	45
MULDER E., MOCHTAR I., Van CREVELD J., LOPES E.B. : Factor VIII activity in carriers of haemophilia A. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1965, <u>11</u> , 206-209.	660	126
MULLER H.P., Van TILBURG N.H., BERTINA R.M., VELTKAMP J.J. : Immunologic studies on the relationship between F VIII related antigen and F VIII procoagulant activity. <i>Thromb. Res.</i> , 1980, <u>20</u> , 85-96.	574	91
MULLER H.P., Van TILBURG N.H., BERTINA R.M., TERWIEL J.P., VELTKAMP J.J. : Immunoradiometric assay of procoagulant factor VIII antigen (VIII:CAg). <i>Clin. Chim. Acta</i> , 1980, <u>107</u> , 11-19.	543 607 617	87 96 97
MULLER H.P., Van TILBURG N.H., DERKS J., KLEIN-BRETELER E., BERTINA R.M. : A monoclonal antibody to VIII:C produced by a mouse hybridoma. <i>Blood</i> , 1981, <u>58</u> , 1000-1006.	580	92
MUNTZ R.H., EKERT H. : Antibodies to factor VIII. <i>Lancet</i> , 1973, <u>2</u> , 160.	282 576	42 92
MURAKI H., WATANABE K., ANDO Y., TOYAMA K., HASEGAWA M. : Reduction of surface negative charge in human platelets by ristocetin. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1977, <u>38</u> , 69.	76	15

	REF.	PAGE
NACHMAN R.L., JAFFE E.A. : The platelet-endothelial cell-VIII axis. Thromb. Haemost., 1976, <u>35</u> , 120-123.	308	46
NACHMAN R.L., JAFFE E.A., FERRIS B. : Peptide map analysis of normal plasma and platelet factor VIII antigen. B.B.R.C., 1980, <u>92</u> , 1208-1214.	234	31
NACHMAN R.L., LEVINE J., JAFFE E.A. : Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes. Clin. Res., 1974, <u>4</u> , 617-624.	289	45
NAKANE P.K., KAWAOI A. : Peroxidase labeled antibody - a new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem., 1974, <u>22</u> , 1084-1091.	672	144
NEAL G.G., CHAVIN S.I. : The role of factor VIII in the activation of bovine blood coagulation factor X. Thromb. Res., 1979, <u>16</u> , 473-484.	22	9
NEAL G.G., CHAVIN S.I. : The role of factors VIII and IX in the activation of bovine blood coagulation factor X. Thromb. Res., 1979, <u>16</u> , 473-484.	636	100
NESS P.M., PERKINS H.A. : A simple immunoassay (EIA) test for factor VIII related antigen (VIII AGN). Thromb. Haemost., 1979, <u>42</u> , 848-858.	352 674	56 144
NEWMAN J., HARRIS R.B., JOHNSON A.J. : Molecular weights of antihaemophilic factor and von Willebrand factor proteins in human plasma. Nature, 1976, <u>263</u> , 612-613.	166 500	24 82
NEWMAN J., JOHNSON A.J., KARPATKIN M.H., PUSZKIN S. : Methods for the production of clinically intermediate and high purity factor VIII concentrates. Brit. J. Haematol., 1971, <u>21</u> , 1-20.	100	18
NILSSON I.A. : Report of the working party on factor VIII related antigens. Thromb. Haemost., 1978, <u>39</u> , 511-520.	348 380	56 59
NILSSON I.M., BLOMBACK M. <u>et al.</u> : Von Willebrand's disease and its correction with human plasma fraction I-0. Acta Med. Scand., 1957, <u>159</u> , 179-188.	14	4
NILSSON I.M., BLOMBACK M., BLOMBACK B. : The use of human antihaemophilic globulin (fraction I-0) in haemophilia A and in von Willebrand's disease. Acta Haematol., 1960, <u>24</u> , 116-123.	392	62
NILSSON I.M., HOLMBERG L., ABERG M., VILHARDT H. : The release of plasminogen activator and factor VIII after injection of DDAVP in healthy volunteers and in patients with von Willebrand's disease. Scand. J. Haematol., 1980, <u>24</u> , 351-359.	315	48
NILSSON I.M., KIRKWOOD T.B., BARROWCLIFFE T.W. : In vivo recovery of factor VIII - A comparison of one-stage and two-stage assay methods. Thromb. Haemost., 1979, <u>42</u> , 1230-1240.	587	93
NILSSON I.M., MEYER D., HOYER L.W., INGRAM G.I.C., RIZZA C.R. : Report of the subcommittee on factor VIII activities. Thromb. Haemost., 1980, 163-166.	608	96

	REF.	PAGE
NILSSON I.M., VILHARDT H., HOLMBERG L., ASTEDT B. : Association between factor VIII related antigen and plasminogen activator. Acta. Med. Scand., 1982, <u>211</u> , 105-112.	316	48
NORMAN J.C., COVELLI V.H., SISE H.S. : Transplantation of the spleen - Experimental cure of hemophilia. Surgery, 1968, <u>64</u> , 1-14.	487	79
NUNEZ-ROLDAN A., ARNAIZ-VILLENA A., NUNEZ-OLLERO G. : Contrôle génétique par la région HLA de la réponse immunitaire au facteur VIII chez les hémophiles. C.R. Acad. Sc. (Paris), 1979, <u>288</u> , 1719-1720.	522	84
NURDEN A.T., CAEN J.P. : Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. Nature, 1975, <u>255</u> , 720-722.	86	16
NYMAN D. : Interaction of collagen with the factor VIII antigen-activity von Willebrand factor complex. Thromb. Res., 1977, <u>11</u> , 433-438.	49	13
NYMAN D. : Von Willebrand factor dependent platelet aggregation and adsorption of F VIII R:Ag by collagen. Thromb. Res., 1980, <u>17</u> , 209-214.	50	13
OFOSU F., CASSIDY K., BLAJCHMAN M.A., HIRSH J. : Immunodepletion of human plasma factor VIII. Blood, 1980, <u>56</u> , 604-607.	592	95
OLSON J.D., BROCKWAY W.J., FASS D.N., BOWIE E.J., MANN K.G. : Purification of porcine and human ristocetin - Willebrand factor. J. Lab. Clin. Med., 1977, <u>89</u> , 1278-1294.	180 194 330, 335 335	26 27 50 51, 52
OSTERUD B., RAPAPORT S.I. : Synthesis of intrinsic factor X activator. Inhibition of the function of formed activator by antibodies to factor VIII and to factor IX. Biochem., 1970, <u>9</u> , 1854.	25	9
OVER J., BOUMA B.N., VAN MOURIK J.A., SIXHA J.J., VLOOSWIJK R., BAKKER-WOUDENBERG I. : Heterogeneity of human factor VIII. I. Characterization, of the factor VIII present in the supernatant of cryoprecipitate. J. Lab. Clin. Med., 1978, <u>91</u> , 32-46.	97	18
OWEN C.A., BOWIE E.J.W. : Rat coagulation factors V, VIII, XI and XII : Vitamin K dependent. Haemostasis, 1978, <u>7</u> , 189-201.	469	78
OWEN C.A., BOWIE E.J.W., FASS D.N. : Generation of factor VIII coagulant activity by isolated, perfused neonatal pig livers and adult rat livers. Brit. J. Haematol., 1979, <u>43</u> , 307-315.	470	78
OWEN W.G., WAGNER R.H. : Antihemophilic factor - a new method for purification. Thromb. Res., 1972, <u>1</u> , 71-88.	701	154
PABST R., HEYES H., RASCHE H., SCHICK P., TREPEL F. : Factor VIII coagulant activity and factor VIII related antigen released from isolated perfused human spleens. Blut, 1977, <u>34</u> , 27-30.	465	79
PASQUINI R., HERSHGOLD E.J. : Effects of plasmin on human factor VIII (AHF). Blood, 1973, <u>41</u> , 105-111.	136	21
PATEK A.J., STETSON R.P. : Hemophilia I : the abnormal coagulation of blood and the relation of platelets. J. Clin. Invest., 1936, <u>15</u> , 531-542.	5	3

	REF.	PAGE
PATEK A.J., TAYLOR F.H. : Hemophilia II : some properties of a substance obtained from normal plasma effective in accelerating the clotting of hemophilic blood. <i>J. Clin. Invest.</i> , 1937, <u>16</u> , 113-124.	6	3
PAULSSEN M.M.P., Van DE GRAAF-WILDSCHUT M., KOLHORN A., PLANJE M.C. : Radioimmunoassay of antihemophilic factor (factor VIII) antigen. <i>Clin. Chim. Acta.</i> , 1975, <u>63</u> , 349-353.	361	57
PAULSSEN M.M.P., VANDENBUSSCHE-SCHEFFERS H.L., SPAAN P.B., De JONG T., PLANJE M.C. : Studies on the characterization of factor VIII and a cofactor VIII. <i>Thromb. Diath. Haemorr.</i> , 1974, <u>31</u> , 328-338.	217	29
	227	30
	243	33
	258'	35
PAULSSEN M.M., WOUTERLOOD A.C., SCHEFFERS H.L. : Purification of the antihemophilic factor by gel filtration on agarose. <i>Thromb. Diath. Haemorr.</i> , 1969, <u>22</u> , 577-583.	107	18
	117	20
PAVLOVSKY A. : Factor VIII antihemophilic globulin. <i>Thromb. Diath. Haemorr.</i> , 1959, <u>3</u> , 658-674.	7	3
PERRET B.A., FURLAN M., KNEUBUEHL F., BECK E. : Fractionation of individual biologically active factor VIII multimers. <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> , 1981, <u>669</u> , 98-104.	165	24
PEAKE I.R., BLOOM A.L. : The dissociation of factor VIII by reducing agents, high salt concentration and affinity chromatography. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1976, <u>35</u> , 191-201.	198	27
	455	77
	647	114
	649	123
PEAKE I.R., BLOOM A.L. : Abnormal factor VIII related antigen (F VIII R:Ag) in von Willebrand's disease (vWD) : Decreased precipitation by concanavalin A. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1977, <u>37</u> , 361-362.	430	73
PEAKE I.R., BLOOM A.L. : Immunoradiometric assay of procoagulant factor VIII antigen in plasma and serum and its reduction in haemophilia. Preliminary studies on adult and fetal blood. <i>Lancet</i> , 1978, <u>8062</u> , 473-475.	539	87
	602	95
PEAKE I.R., BLOOM A.L., GIDDINGS J.C., LUDLAM C.A. : An immunoradiometric assay for procoagulant factor VIII antigen - Results in haemophilia, von Willebrand's disease and fetal plasma and serum. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1979, <u>42</u> , 269-281.	604	96
	615	97
PERRET B.A., FURLAN M., BECK E.A. : Studies on factor VIII-related protein. II : estimation of molecular size differences between factor VIII oligomers. <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> , 1979, <u>578</u> , 164-174.	148	22
PIETU G., OBERT B., LARRIEU M.J., MEYER D. : Structure-function relationship of factor VIII/von Willebrand factor. Application to the study of variant von Willebrand's disease and cryosupernatant prepared from normal plasma. <i>Thromb. Res.</i> , 1980, <u>19</u> , 671-685.	162	23
PIOVELLA F., GIDDINGS J.C., PEAKE I.R., RICETTI M., SHEARN S., BLOOM A.L. : Synthesis of procoagulant anti-hemophilic factor in vitro. <i>Lancet</i> , 1978, <u>2</u> , 888-889.	479	79

	REF.	PAGE
PIOVELLA F., NALLI G., MALAMANI G.D. <u>et al.</u> : The ultrastructural localization of factor VIII antigen in human platelets, megakaryocytes and endothelial cells utilizing a ferritin-labelled antibody. Brit. J. Haematol., 1978, <u>39</u> , 209-214.	296 307	45 46
PIPER N., SCHREIER M.H. : Uber den immunologischen nachweis von factor VIII-protein im bluterplasma and seine bedeutung für das verständnis der hämophilie A. Thromb. Diath. Haemorr., 1964, <u>11</u> , 423.	273	41
PIZZUTO J., AMBRIZ R., DE LA PAZREINA M., MONRROY L.M., MORALES M.R., AVILES A., CONTE G., ENRIQUEZ R. : Acquired von Willebrand's syndrome during autoimmune disorder. Thromb. Haemost., 1979, <u>42</u> , 1523-1528.	692	152
POOL J.G. : Antihemophilic globulin activity in spleen. Fed. Proc., 1966, <u>25</u> , 317.	483	79
POOL J.G., SHANNON A.E. : Production of high potency concentrates of anti-hemophilic globulin in a closed bag system. N. Engl. J. Med., 1965, <u>273</u> , 1443.	96	18
POOLE-WILSON P.A.. Acquired von Willebrand's syndrome and systemic lupus erythematosus. Proc. Soc. Med., 1972, <u>65</u> , 7-8.	681	150
POON M.C., RATNOFF O.D. : Evidence that functional subunits of antihemophilic factor (factor VIII) are linked by noncovalent bonds. Blood, 1976, <u>48</u> , 87-94.	213	28
POTTER E.V., CHEDIAL J., GREEN D. : Absence of ristocetin aggregation factor from the skin of a patient with von Willebrand's disease. Lancet, 1976, <u>1</u> , 514.	295	45
PRENTICE C.R.M., FORBES C.D., SMITH S.M. : Rise of factor VIII after exercise and adrenalin infusion, measured by immunological and biological techniques. Thromb. Res., 1972, <u>1</u> , 493-506.	663	133
QUICK A.J., HUSSEY C.V. : Hemophilic condition in the female. J. Lab. Clin. Med., 1953, <u>42</u> , 929-930.	11	4
RAND J.H., SUSSMAN I.I., GORDON R.E., CHU S.V., SOLOMON V. : Localization of factor VIII-related antigen in human vascular sub-endothelium. Blood, 1980, <u>55</u> , 756-757.	298 309	45 46 et 47
RATNOFF O.D., JONES P.K. : The laboratory diagnosis of the carrier state for classic hemophilia. Ann. Int. Med., 1977, <u>86</u> , 521-528.	666	133
RATNOFF O.D., KASS L., LANG P.D. : Studies on the purification of antihemophilic factor (factor VIII) II. Separation of partially purified antihemophilic factor by gel filtration on plasma. J. Clin. Invest., 1969, <u>48</u> , 957-962.	106 109 118 128	18 19 20 21
RATNOFF O.D., LEWIS J.H. : Heckathorn's disease : variable fonctionnal deficiency of antihemophilic factor (factor VIII). Blood, 1975, <u>46</u> , 161-173.	623	98
RATNOFF O.D., SAITO H. : Bleeding in von Willebrand's disease. N. Engl. J. Med., 1974, <u>290</u> , 1089.	382	60

	REF.	PAGE
RATNOFF O.D., SLOVER C.C., POON M.C. : Immunologic evidence that the properties of human antihemophilic factor (factor VIII) are attributes of a single molecular species. <i>Blood</i> , 1976, <u>47</u> , 657-667.	458 573	77 91
REISNER H.M., BARROW E.S., GRAHAM J.B. : Radioimmunoassay for coagulant factor VIII-related antigen (VIII:CAg). <i>Thromb. Res.</i> , 1979, <u>14</u> , 235-239.	541	87
REISNER H.M., BARROW E.S., GRAHAM J.B. : Radioimmunoassay for coagulant factor VIII-related antigen (VIII:CAg). <i>Thromb. Res.</i> , 1979, <u>14</u> , 235-239.	606 618	96 97
RICK M.E., HOYER L.W. : Immunologic studies of antihemophilic factor VIII. Immunologic properties of AHF subunits produced by salt dissociation. <i>Blood</i> , 1973, <u>42</u> , 737-747.	113 205 572	19 28 91
RICK M.E., HOYER L.W. : Molecular weight of human factor VIII procoagulant activity. <i>Thromb. Res.</i> , 1975, <u>7</u> , 909-916.	498	82
RICKLES F.R., HARDIN J.A., PITLICK F.A. et al. : Tissue factor activity in lymphocyte cultures from normal individuals and patients with hemophilia A. <i>Amer. J. Clin. Invest.</i> , 1973, <u>52</u> , 1427-1434.	477	79
ROBBOY S.J., LEWIS E.J., SCHUR P.H., COLMAN R.W. : Circulating anticoagulants to factor VIII : immunochemical studies and clinical response to factor VIII concentrates. <i>Amer. J. Med.</i> , 1970, <u>49</u> , 742-752.	564	90
ROCK G., CRUICKSHANK W.H., PALMER D.S. : Variant forms of procoagulant-like factor VIII in hemophiliacs. <i>Thromb. Res.</i> , 1981, <u>21</u> , 53-63.	513 640	83 100
ROCK G.A., PALMER D.S., TACKABERRY E.S., CRUICKSHANK W.H. : The presence of high and low molecular weight forms of factor VIII in heparinized plasma. <i>Thromb. Res.</i> , 1978, <u>13</u> , 85-96.	501	82
ROCK G.A., TACKABERRY E.S., PALMER D.S. : Factors affecting the relative distribution of high and low molecular weight forms of factor VIII. <i>Thromb. Res.</i> , 1979, <u>14</u> , 573-587.	168	24
ROSBOROUGH T.K., SWAIM W.R. : Acquired von Willebrand's disease, platelet release defect and angiodysplasia. <i>Amer. J. Med.</i> , 1978, <u>65</u> , 96-100.	688	151
ROSENFELD L., KIRBY E.P. : The effect of neuraminidase treatment on the biological activities of factor VIII. <i>Thromb. Res.</i> , 1979, <u>15</u> , 255-261.	248 442 719	33 73 209
ROSNER F. : Hemophilia in the Talmud and rabbinic writings. <i>Ann. Intern. Med.</i> , 1969, <u>70</u> , 833-837.	1	3
ROSS R., GLOMSET J., KARIYA N., HARKER L. : A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. <i>Proc. Nat. Acad. Sci. US-Biol. Sci.</i> , 1974, <u>71</u> , 1207-1210.	408	66
ROTLAT F., TUDDENHAM E.G.D. : Immunologic studies of factor VIII coagulant activity (VIII:C) I. Assays based on a haemophilic and an acquired antibody to VIII:C. <i>Thromb. Res.</i> , 1981, <u>21</u> , 431-445.	610 620	96 97
ROUSSI J.H., HOUBOUYAN L.L., ALTERESCU R., FRANC B., GOGUEL A.F. : Acquired von Willebrand's syndrome associated with hairy cell leukaemia. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1980, <u>46</u> , 503-506.	697	152

	REF.	PAGE
RUAN C., TOBELEM G., CAEN J.P. : Liaison du facteur VIII/Willebrand aux plaquettes de syndrome de Bernard-Soulier et de thrombasthenie de Glanzmann. <i>Nouv. Rev. Fr. Hematol.</i> , 1981, <u>23</u> , 89-93.	60 85	14 et 15 16
RUDZKI Z., TUNBRIDGE L.J., LLOYD J.V. : A new simple assay for factor VIII related antigen. <i>Thromb. Res.</i> , 1979, <u>16</u> , 577-586.	355	56 et 57
RUGGERI Z.M., PARETI F.I., MANNUCCI P.M., CIAVARELLA N., ZIMMERMAN T.S. : Height interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. <i>N. Engl. J. Med.</i> , 1980, <u>302</u> , 1047-1051.	372	58
RUGGERI Z.M., ZIMMERMAN T.S. : Variant von Willebrand's disease. Characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. <i>J. Clin. Invest.</i> , 1980, <u>65</u> , 1318-1325.	83 163 188 201 420	16 24 26 27 69
SAKARIASSEN K.S., BOLHUIS P.A., SIXMA J.J. : Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bound to the subendothelium. <i>Nature</i> , 1979, <u>279</u> , 636-638.	45 310 417	13 46 68
SALZMAN E.W. : Measurement of platelet adhesiveness : a single in vitro technique demonstrating an abnormality in von Willebrand's disease. <i>J. Lab. Clin. Med.</i> , 1963, <u>62</u> , 724-734.	17 365	4 58
SANTORO S.A. : Adsorption of von Willebrand factor/factor VIII by the genetically distinct interstitial collagens. <i>Thromb. Res.</i> , 1981, <u>21</u> , 689-693.	53	13
SANTORO S.A., COWAN J.F. : Adsorption of von Willebrand factor by fibrillar collagen. Implications concerning the adhesion of platelets to collagen. <i>Collagen. Rel. Res.</i> , 1982, <u>2</u> , 31-43.	54	13 et 14
SARJI K.E., STRATTON R.D., WAGNER R.H., BRINKHOUS K.M. : Nature of von Willebrand factor : A new assay and a specific inhibitor. <i>Proc. Nat. Acad. Sci. US-Biol. Sci.</i> , 1974, <u>71</u> , 2937-2941.	67 337	15 54
SCHNEIDER-TRIP M.D., JENKINS C.S., KAHLE L.H., STURK A., TENCATE J.W. : Studies on the mechanism of ristocetin-induced platelet aggregation : binding of factor VIII to platelets. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1979, <u>43</u> , 99-112.	62	15
SCHNEIDER P., TRAN-THANG C., MAILLARD M., BACHMANN F. : Syndrome de von Willebrand acquis associé à un lymphome malin. <i>Schweiz. Med. Wochenschr.</i> , 1979, <u>109</u> , 1390.	691	152
SCHÖSSLER W., STEPANAUSKAS M., DITTRICH C., Van EICHORN C. : Quantitative bestimmung von factor VIII-antigen mit einem enzymimmunoassay. <i>Acta. Biol. Med. Germ.</i> , 1982, <u>41</u> , 695-703.	677	144
SCOTT D.M., GRIFFIN B., PEPPER D.S., BARNES M.J. : The binding of purified factor VIII/vWF to collagens of differing type and form. <i>Thromb. Res.</i> , 1981, <u>24</u> , 467-472.	56	14
SCOTT J.P., MONTGOMERY R.R., TUBERGEN D.G., HAYS T. : Acquired von Willebrand's disease in association with Wilms' tumor : regression following treatment. <i>Blood</i> , 1981, <u>58</u> , 665-669.	700	52

SEGHATCHIAN M.J., KEMBALL-COOK G., BARROWCLIFFE T.W. : Absorption of factor VIII by aluminium hydroxide. Haemostasis, 1979, <u>8</u> , 106-116.	593	95
SEGHATCHIAN M.J., MILLER-ANDERSSON M. : A colorimetric evaluation of factor VIII:C potency. Med. Lab. Sci., 1978, <u>35</u> , 347-354.	584	94
SEGHATCHIAN M.J., NILSSON I.M., HOLMBERG L., MILLER-ANDERSON M.: Molecular size distribution of factor VIII in native plasma. Thromb. Res., 1979, <u>14</u> , 589-598.	167	24
SHANBERGE J.N., GORE I. : Studies on the immunologic and physiologic activities of antihemophilic factor. J. Lab. Clin. Med., 1957, <u>50</u> , 954.	258 264 272	38 39 41
SHAPIRO G.A., ANDERSEN J.C., PIZZO S.V., Mc KEE P.A. : The subunit structure of normal and hemophilic factor VIII. J. Clin. invest., 1973, <u>52</u> , 2198-2210.	114 123 139 170 177 196 229	19 20 21 25 26 27 31 et 32
SHAPIRO S.S. : The immunologic character of acquired inhibitors of antihemophilic globulin (factor VIII) and the kinetics of their interaction with factor VIII. J. Clin. Invest., 1967, <u>46</u> , 147-156.	563	90
SHAPIRO S.S. : Characterization of factor VIII antibodies. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1975, <u>240</u> , 350-360.	567	90
SHAPIRO S.S. : Antibodies to blood coagulation factors. Clin. Haematol., 1979, <u>9</u> , 207-214.	519	84
SHAPIRO S.S., HULTIN M. : Acquired inhibitors to the blood coagulation factors. Sem. Thromb. Haemost., 1975, <u>1</u> , 336-385.	516	84
SHAW E., GIDDINGS J.C., PEAKE I.R., BLOOM A.L. : Synthesis of procoagulant factor, factor VIII related antigen and other coagulation factors by the isolated perfused rat liver. Brit. J. Haematol., 1979, <u>41</u> , 585-596.	472	78
SHEARN S.A., GIDDING J.C., PEAKE I.R., BLOOM A.L. : A comparison of five different rabbit antisera to factor VIII and the demonstration of a factor VIII related antigen in normal and von Willebrand's disease platelets. Thromb. Res., 1974, <u>5</u> , 585-599.	266	40
SHEARN S.A., PEAKE I.R., GIDDINGS J.C., HUMPHRYS J., BLOOM A.L. : The characterization and synthesis of antigens related to factor VIII in vascular endothelium. Thromb. Res., 1977, <u>11</u> , 43-56.	283 305	42 46
SHOAI I., LAVERGNE J.M., ARDAILLOU N., OBERT T., ALA F., MEYER D. : Heterogeneity of von Willebrand's disease : study of 40 Iranian cases. Brit. J. Haematol., 1977, <u>37</u> , 67-83.	340	54
SILWER J., CRONBERG S., NILSON I.M. : Occurrence of arteriosclerosis in von Willebrand's disease. Acta. Med. Scand., 1966, <u>180</u> , 475-484.	410	66
SIMONE J.V., CORNET J.A., ABILDGAARD C.F. : Acquired von Willebrand's syndrome in systemic lupus erythematosus. Blood, 1968, <u>31</u> , 806-812.	678	150

	REF.	PAGE
SIMONE J.V., VANDERHEIDEN X., ABILDGAARD C.F. : A semi-automatic one-stage factor VIII assay with a commercially prepared standard. J. Lab. Clin. Med., 1967, <u>69</u> , 706-712.	665	133
SIMONETTI C., CASILLAS G., PAVLOVSKY A. : Tannic acid purification of factor VIII. In : "The hemophilia" ed. by K.M. BRINKHOUS, 1964, 100-105.	95	17
SMITH J.K. and BIDWELL E. : Therapeutic materials used in the treatment of coagulation defects. Clin. Haematol., 1979, <u>35</u> , 186-191.	102	18
SODETZ J.M., PAULSON J.C., Mc KEE P.A. : Carbohydrate composition and identification of blood group A, B, and H oligosaccharide structures on human factor VIII/von Willebrand factor. J. Biol. Chem., 1979, <u>254</u> , 10754-10760.	247 706,708 709' 718 725	33 207 208 209 210,220
SODETZ J.M., PAULSSON J., PIZZO S.V., Mc KEE P.A. : Carbohydrate on human factor VIII/von Willebrand factor. Impairment of function by removal of specific galactose residues. J. Biol. Chem., 1978, <u>253</u> , 7202-7206.	249 449 709	34 74 208
SODETZ J.M., PIZZO S.V., Mc KEE P. : Relationship of sialic acid to function and in vivo survival of human factor VIII/von Willebrand factor protein. J. Biol. Chem., 1977, <u>252</u> , 5538-5546.	245 441,447 716	33 et 34 73 209
SOLA B., AVNER P., SULTAN Y., JEANNEAU C., MAISONNEUVE P. : Monoclonal antibodies against factor VIII molecule neutralize antihemophilic factor and ristocetin cofactor activities. Proc. Nat. Acad. Sci. US-Biol. Sci, 1982, <u>79</u> , 183-187.	262 570	38 et 39 91
SOULIER J.P., LARRIEU M.J. : Nouvelle methode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des facteurs antihémophiliques A et B. Sang., 1953, <u>24</u> , 205-215.	581	93
STABLEFORTH P., TAMAGNINI G.L., DORMANDY K.M. : Acquired von Willebrand syndrome with inhibitors both to factor VIII clotting activity and ristocetin-induced platelet aggregation. Brit. J. Haematol., 1976, <u>33</u> , 565-573.	687	151
STEAD N.W., Mc KEE P. : Destruction of Factor VIII procoagulant activity in tissue culture media. Blood, 1978, <u>52</u> , 408-424.	460	77
STEAD N.W., Mc KEE P. : The effect of cultured endothelial cells on factor VIII procoagulant activity. Blood, 1979, <u>54</u> , 560-572.	461	77
STITES D.P., HERSHGOLD E.J., PERLMAN J.D., FUDENBERG H.M. : Factor VIII detection by hemagglutination inhibition : Haemophilia A and von Willebrand's disease. Science, 1971, <u>171</u> , 196-197.	358	57
STRATTON R.D., WAGNER R.H., WEBSTER W.P., BRINKHOUS K.M. : Antibody nature of circulating inhibitor of plasma von Willebrand factor. Proc. Nat. Acad. Sci. US-Biol. Sci, 1975, <u>72</u> , 4167-4171.	338 341	54 55
STRAUSS H.S. : Acquired circulating anticoagulants in hemophilia A. N. Engl. J. Med., 1969, <u>281</u> , 866-873.	514	84
SULTAN Y. : La maladie de Willebrand en 1978. Rev. Med., 1978, <u>42</u> , 2362-2365.	390	61

	REF.	PAGE
SULTAN Y., JEANNEAU C., LAMAZIERE J., MAISONNEUVE P., CAEN J.P. : Platelet factor VIII related antigen in vivo studies after transfusion in patients with von Willebrand's disease. Blood, 1978, <u>51</u> , 751-761.	290	45
SULTAN Y., SIMEON J., CAEN J.P. : Electrophoretic heterogeneity of normal factor VIII/Von Willebrand protein, and abnormal electrophoretic mobility in patients with von Willebrand's disease. J. Lab. Clin. Med., 1976, <u>87</u> , 185-197.	145	22
SUOMELA H., BLOMBACK M., BLOMBACK B. : The activation of factor X evaluated by using synthetic substrates. Thromb. Res., 1977, <u>10</u> , 267-281	26	9
SUSSMAN I.I., ROSNER W., WEISS H.J. : Concentration-dependent dissociation of factor VIII in 1 M NaCl. Amer. J. Physic., 1976, <u>230</u> , 434-440.	209	28
SUSSMAN I.I., WEISS H.J. : Spontaneous aggregation of low molecular weight factor VIII and its prevention by 2mM CaCl ₂ . Thromb. Res., 1976, <u>9</u> , 267-276.	212	28
SUSSMAN I.I., WEISS H.J. : Dissociation of factor VIII in the presence of proteolytic inhibitors. Thromb. Haemost., 1978, <u>40</u> , 316-325.	211	28
SUZUKI K., NISHIOKA J., MASHIMOTO S. : Vancomycin as well as ristocetin facilitates von Willebrand factor binding to platelets. Thromb. Res., 1980, <u>19</u> , 287-292.	73	15
SWITZER M.E., Mc KEE P.A. : Studies on human antihemophilic factor. Evidence for a covalently linked subunit structure. J. Clin. Invest., 1976, <u>57</u> , 925-937.	208 462 497	28 78 81
SWITZER M.E., Mc KEE P.A. : Reactions of thrombin with human factor VIII/von Willebrand factor protein. J. Biol. Chem., 1980, <u>255</u> , 10606-10611.	639	100
SWITZER M.E., PIZZO S.V., Mc KEE P.A. : Is there a precursive, relative procoagulant inactive form of normal antihemophilic factor (factor VIII)? Blood, 1979, <u>54</u> , 916-927.	463 496	78 81
TAKAHASHI H. : Studies on the pathophysiology and treatment of von Willebrand's disease - IV - Mechanism of increased ristocetin - induced platelet aggregation in von Willebrand's disease. Thromb. Res., 1980, <u>19</u> , 857-867.	373	58
TAKAHASHI H., SAKURAGAWA N., SHIBATA A. : Decreased precipitation of factor VIII R:Ag with concanavalin A in patients with a variant of vWD and disseminated intravascular coagulation. Tohoku J. Exp. Med., 1980, <u>132</u> , 141-146.	431	73
TAN H.K., ANDERSEN J.C. : Human factor VIII : Morphometric analysis of purified material in solution. Science, 1977, <u>198</u> , 932-934.	154	22
THOMAS K.B., HOWARD M.A., KOUTTS J., FIRKIN B.G. : Simplified immunoradiometric assay for factor VIII coagulant antigen. Brit. J. Haematol., 1982, <u>51</u> , 47-57.	613 657	96 124
THOMSON C., FORBES C.D., PRENTICE C.R.M. : Relationship of factor VIII to ristocetin-induced platelet aggregation : effect of heterologous and acquired factor VIII antibodies. Thromb. Res., 1973, <u>3</u> , 363-372.	549 653	88 123

	REF.	PAGE
THUY L.P., BROWN J.E., BAUGH R., HOUGIE C. : Effects of succinylation and dodecyl succinylation on bovine factor VIII/von Willebrand factor complex. <i>Thromb. Res.</i> , 1980, <u>18</u> , 305-313.	634	100
TRAN T.H., MARBET O.A., DUCKERT F. : Rabbit antibodies against the procoagulant activity (VIII:C) of human factor VIII. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1981, <u>46</u> , 699-705.	577	92
TSCHOPP T.B., WEISS H.J., BAUMGARTNER H.R. : Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrand's disease. <i>J. Lab. Clin. Med.</i> , 1974, <u>83</u> , 296-300.	38	12
TUDDENHAM E.G., LAZARCHICK J., HOYER L.W. : Synthesis and release of factor VIII by cultured human endothelial cells. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1981, <u>47</u> , 617-626.	306 317	46 48
TUDDENHAM E.G.D., SHEARN S.A., PEAKE I.R. : Tissue localization and synthesis of factor VIII related antigen in the human factor. <i>Brit. J. Haematol.</i> , 1974, <u>26</u> , 669-677.	293	45
TUDDENHAM E.G.D., TRABOLD W.C., COLLINS J.A., HOYER L.W. : The properties of factor VIII coagulant activity prepared by immunoabsorbant chromatography. <i>J. Lab. Clin. Med.</i> , 1979, <u>93</u> , 40-53.	512	83
USZYNSKI L. : The immunological properties of factor VIII. II. The immunoelectrophoretic studies. <i>Thromb. Diath. Haemorrh.</i> , 1967, <u>18</u> , 325-331.	280	41
VAINER H., CAEN J. : Etude immunoélectrophorétique des plasmas d'hémophile A et de maladie de Willebrand. <i>Nouv. Rev. Fr. Hematol.</i> , 1965, <u>4</u> , 691.	279	41
VARADI K., ELODI S. : Increased resistance of factor IXa-factor VIII complex against inactivation by granulocyte proteases. <i>Thromb. Res.</i> , 1980, <u>19</u> , 571-578.	32	11
VARADI K., ELODI S. : Protection of platelet surface bound factors IXa and VIII against specific inhibitors. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1982, <u>47</u> , 32-35.	31	11
VARADI K., HEMKER H.C. : Kinetics of the formation of the factor X activating enzyme of the blood coagulation system. <i>Thromb. Res.</i> , 1976, <u>8</u> , 303 - 317.	27	9
VEDER H.A. : Further purification of the antihaemophilic factor (AHF). <i>Thromb. Diath. Haemorrh.</i> , 1966, <u>16</u> , 738-751.	218	29
VEDER H.A. : Is the antihemophilic globulin a protein. <i>Nature</i> , 1966, <u>209</u> , 202.	219	29
VEHAR G.A., DAVIE E.W. : Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor). <i>Biochem.</i> , 1980, <u>19</u> , 401-410.	19	6
VEHAR G.A., DAVIE E.W. : Formation of a serine enzyme in the presence of bovine factor VIII (antihemophilic factor) and thrombin. <i>Science</i> , 1977, <u>197</u> , 374 - 376	36'	12
VEHAR G., DAVIE E. : Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor). <i>Biochem.</i> , 1980, <u>19</u> , 401-410.	495 508	81 82

- VELTKAMP J.J., STEVENS P., PLAS M.V.D., LOELIGER E.A. : Production site of bleeding factor (acquired morbus von Willebrand). *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 1970, 23, 412. 679 150
- VERMYLEN J., BOTTECHIA D., SZPILMAN H. : Factor VIII and human platelet aggregation. III. Further studies on aggregation of human platelets by neuraminidase- treated human factor VIII. *Brit. J. Haematol.*, 1976, 34, 321-330. 435,444 73
- VERMYLEN J., DONATI M.B., DE GAETANO G., VERSTRAETE M. : Aggregation of human platelets by bovine or human factor VIII : role of carbohydrate. *Nature*, 1973, 244, 167-168. 445 73
- VUKOVICH T., KOLLER E., DOLESCHER W. : The influence of thrombin on the clotting activity of factor VIII. A study with insolubilized thrombin. *Thromb. Haemost.*, 1978, 39, 600-606. 637 100
- VUKOVICH T., KOLLER E., DOLESCHER W. : The influence of thrombin on the clotting activity of F VIII (letter). *Thromb. Res.*, 1980, 18, 297. 638 100
- WALL R.T., COUNTS R.B., MARKER L.A., STRIKER G.E. : The demonstration and characterization of endothelial cell binding sites for factor VIII/von Willebrand factor. *Brit. J. Haematol.*, 1980, 46, 287-298. 299 45
- WARREN L. : The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 1971-1975. 724' 209
- WAUTIER J.L., LEVY-TOLEDANO S., CAEN J. : Acquired von Willebrand's syndrome and thrombopathy in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *Scand. J. Haematol.*, 1976, 16, 128-134. 686 151
- WEAVER R.A., PRICE R.E., LANGDELL R.D. : Antihemophilic factor in cross-circulated normal and hemophilic dog. *Amer. J. Physiol.*, 1964, 206, 335-337. 482 79
- WEBSTER W.P., MANDEL S.R., STRIKE L.E., PENICK G.D., GRIGGS T.R., BRINKHOUS K.M. : Factor VIII synthesis : hepatic and venal allografts in swine with von Willebrand's disease. *Amer. J. Physiol.*, 1976, 230, 1342-1348. 467 78
493 80
- WEBSTER W.P., PENICK G.D. : Release of factor VIII from perfused organs. *Fed. proc.*, 1967, 26, 487. 484 79
- WEBSTER W.P., ROBERTS H.R., THELIN G.M., WAGNER R.H., BRINKHOUS K.M. : Clinical use of a new glycine-precipitated antihemophilic fraction. *Amer. H. Med. Sci.*, 1965, 250, 643-651. 98 18
- WEBSTER W.P., ZUBOSKI C.F., HUTCHIN P., REDDICK R.L., MANDEL S.T., PENICK G.D. : Plasma factor VIII synthesis and control as revealed by canine organ transplantation. *Amer. J. Physiol.*, 1971, 220, 1147-1154. 466 78
486 79
- WEINSTEIN M., CHUTE L., DEYKIN D. : Analysis of factor VIII coagulant antigen in normal, thrombin treated and hemophilic plasma. *Proc. Nat. Acad. Sci. US-Biol. Sci.*, 1981, 78, 5137-5141. 507 82
- WEISS H.J. : Relation in von Willebrand factor to bleeding time. *N. Engl. J. Med.*, 1974, 291, 420. 383 60

WEISS H.J., BALL A.P., MANNUCCI P.M. : Incidence of severe von Willebrand's disease. N. Engl. J. Med., 1982, <u>307</u> , 127.	412	67
WEISS H.J., BAUMGARTNER H.R., TSCHOPP T.B., TURITTO V.T. : Interaction of platelets with subendothelium : a new method for identifying and classifying abnormalities of platelet function. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1977, <u>283</u> , 293-309.	41	12
WEISS H.J., HOYER L.W. : Von Willebrand factor : Dissociation from antihemophilic factor procoagulant activity. Science, 1973, <u>182</u> , 1149-151.	158 204	23 28
WEISS H.J., HOYER L.W., RICKLES F.R., VARMA A., ROGERS J. : Quantitative assay of a plasma factor, deficient in von Willebrand's disease, that is necessary for platelet aggregation. Relationship to factor VIII procoagulant activity and antigen content. J. Clin. Invest., 1973, <u>52</u> , 2708-2716.	79 375 381 384	15 59 59 60
WEISS H.J., KOCHWA S. : Molecular forms of antihemophilic globulin in plasma, cryoprecipitate and after thrombin activation. Brit. J. Haematol., 1970, <u>18</u> , 89-100.	159 203 327	23 28 49
WEISS H.J., MEYER D., RABINOWITZ R., PIETU G., GIRMA J.P., VICIC W.J., ROGERS J. : Pseudo-von Willebrand's disease. An intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high-molecular-weight multimers. N. Engl. J. Med., 1982, <u>306</u> , 326-333.	400	65
WEISS H.J., PHILLIPS L.L., ROSNER W. : Separation of subunits of antihemophilic factor by agarose gel chromatography. Thromb. Diath. Haemorrh., 1971, <u>27</u> , 212-219.	122 142	20 22
WEISS H.J., ROGERS J., BRAND H. : Defective Ristocetin-induced platelet aggregation in von Willebrand's disease and its correction by factor VIII. J. Clin. Invest., 1973, <u>52</u> , 2697-2707.	370 550	58 88
WEISS H.J., SUSSMAN I.I., HOYER L.W. : Stabilisation of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor : Studies post-transfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. J. Clin. invest., 1977, <u>60</u> , 390-404.	394	62
WEISS H.J., TSCHOPP T.B., BAUMGARTNER H.R. : Impaired interaction (adhesion-aggregation) of platelets with subendothelium in storage-pool disease and after aspirin ingestion : Comparison with von Willebrand's disease. N. Engl. J. Med., 1975, <u>293</u> , 619-623.	39	12
WEISS H.J., TURITTO V.T., BAUMGARTNER H.R. : Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood. I. Shear dependent decrease of adhesion in von Willebrand's disease and the Bernard-Soulier syndrome. J. Lab. Clin. Med., 1978, <u>32</u> , 750-764.	43	13
Von WILLEBRAND E.A. : Hereditar pseudohamofili. Finsk Lakaresallsk Handl. 1926, <u>68</u> , 87-112.	12	4
Von WILLEBRAND E.A., JÜRGENS R. : Über ein neues vererbbares blut ungelabelt : die konstitutionelle thrombopathie. Dtsch. Arch. Klin. Med., 1933, <u>175</u> , 453-483.	13	14

	REF.	PAGE
WRIGHT A.E. : On the method of determining the condition of blood coagulability for clinical and experimental purpose. Br. Med. J., 1893, <u>2</u> , 223-225.	3	3
YORDE L.D., HUSSEY C.V., YORDE D.E., SASSE E.A. : Competitive enzyme-linked immunoassay for factor VIII antigen. Clin. Chem., 1979, <u>25</u> , 1924-1927.	353 675	56 144
YODER J.M., SCHICK L.A., MOORE R.P. : A convenient rapid fluoroimmunoassay for factor VIII R:Ag. Thromb. Res., 1981, <u>24</u> , 51-59.	356	56
ZACHARSKI L.R., BOWIE E.J.W., TITUS J.L. <u>et al.</u> Synthesis of antihemophilic factor (factor VIII) by leucocytes - preliminary report. Mayo. Clin. Proc., 1968, <u>43</u> , 617-619.	476	79
ZETTERVALL I., NILSSON I.G. Acquired von Willebrand's disease caused by a monoclonal antibody. Acta Med. Scand., 1978, <u>204</u> , 521-528.	689	151
ZIMMERMAN T.S., ABILDGAARD C., MEYER D. : The factor VIII abnormality in severe von Willebrand's disease. N. Engl. J. Med., 1979, <u>301</u> , 1307.	250	56 et 57
ZIMMERMAN T., EDGINGTON T. : Factor VIII coagulant activity and factor VIII-like antigen : independent molecular entities. J. Exp. Med., 1973, <u>138</u> , 1015-1020.	554 656	89 127
ZIMMERMAN T.S., DE LA POINTE L., EDGINGTON T.S. : Interaction of factor VIII antigen in hemophilic plasmas with human antibodies to factor VIII. J. Clin. Invest., 1979, <u>59</u> , 984-989.	601	95
ZIMMERMAN T.S., RATNOFF O.D., LITTELL A.S. : Detection of carriers of classic hemophilia using an immunologic assay for antihemophilic factor (factor VIII). J. Clin. Invest., 1971, <u>50</u> , 255-258.	661	126
ZIMMERMAN T.S., RATNOFF O.D., POWELL A.E. : Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. J. Clin. Invest., 1971, <u>50</u> , 244-254.	18 259 276 281 347 357	6 38 41 42 56 57
ZIMMERMAN T.S., ROBERTS J., EDGINGTON T.S. : Factor VIII-related antigen : multiple molecular forms in human plasma. Proc. Nat. Acad. Sci. US-Biol. Sci., 1975, <u>72</u> , 5121-5125.	144 160	22 23
ZIMMERMAN T.S., VOSS R., EDGINGTON T.S. : Carbohydrate of the factor VIII/von Willebrand factor in von Willebrand's disease. J; Clin. Invest., 1979, <u>64</u> , 1298-1302.	427	71
ZUCKER M.B., KIM S.J., Mc PHERSON J., GRANT R.A. : Binding of factor VIII to platelets in the presence of ristocetin. Brit. J. Haematol., 1977, <u>35</u> , 535-550.	70 83'	15 16
ZUZEL M., NILSSON I.M., ABERG M. : A method for measuring plasma ristocetin cofactor activity. Normal distribution and stability during storage. Thromb. Res., 1978, <u>12</u> , 745-754.	388	60

