

50376
1988
133

50376
1988
133

T H E S E

N° d'ordre 206

PRÉSENTÉE À

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

PAR

CHRISTOPHE DE ROMEUF



ETUDE FONCTIONNELLE DU FACTEUR WILLEBRAND DANS L'ADHESION

PLAQUETTAIRE PAR UN SYSTEME DE PERFUSION

PRÉSENTÉE LE ~~18~~ MARS 1988 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

PRÉSIDENT	:	J. MONTREUIL
RAPPORTEURS	:	G. SPIK J. SIXMA
EXAMINATEURS	:	M. GOUEMAND C. MAZURIER

REMERCIEMENTS

A Madame le Docteur Claudine MAZURIER

Tes qualités et ta passion pour la recherche ont permis au Laboratoire d'Hémostase du C.R.T.S de Lille d'acquérir une renommée mondiale. Je te remercie de tes nombreux conseils et de l'aide dévouée que tu m'as accordée.

Par cette thèse, je t'exprime ma profonde reconnaissance et mon amitié.

A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL

C'est grâce à vous et à la confiance que vous m'avez accordée alors que j'étais étudiant en maîtrise de Biochimie, que j'ai pu m'intégrer à une équipe de recherche au C.R.T.S. de Lille. Vos conseils et votre aide m'ont toujours été précieux.

J'apprécie l'honneur que vous me faites aujourd'hui en présidant ce jury. Veuillez trouver ici l'assurance de ma profonde reconnaissance et de mon respect.

A Mademoiselle le Professeur Geneviève SPIK

Votre gentillesse et la qualité de votre enseignement ont favorisé mon goût pour la biochimie lors de mes études à l'Université de Lille I.

Ce mémoire est soumis à votre appréciation. Je vous exprime mes plus profonds remerciements d'avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur Jan SIXMA

You were extremely kind to welcome me at your laboratory to learn the technical of platelet adhesion. This work is the result of a close collaboration with your group.

I take this opportunity to give you proof of my gratitude for the constant interest and the efficacy you have always brought in my work.

A Monsieur le Professeur Maurice GOUEMAND

Cette thèse est pour moi l'occasion de vous exprimer toute ma gratitude pour la bienveillance avec laquelle vous m'avez accepté dans votre établissement, au sein d'une équipe de recherche.

Votre jugement scientifique ainsi que l'aide et l'intérêt que vous avez portés au développement du laboratoire de recherche sur l'hémostase du C.R.T.S de Lille, m'ont permis de vous percevoir en tant que conseiller scientifique et de bénéficier de vos conseils. Qu'il me soit permis de vous témoigner mon respectueux attachement.

A Monsieur le Docteur Jean-Jacques HUART

Vous m'avez accordé votre confiance en m'engageant dans votre établissement. Votre sympathie, votre force de travail et vos compétences seront sans nul doute un atout majeur pour l'avenir du Centre de Transfusion de Lille.

Veillez trouver ici, l'assurance de mon profond respect et de mon amitié.

A Monsieur le Docteur Bruno SAMOR

C'est essentiellement avec toi que j'ai partagé ces années de travail, qui ont permis d'élaboration de ce mémoire. Tes qualités de chercheur, ta franchise et ta serviabilité m'ont été d'un grand recours.

Pour tout cela, je t'exprime ma gratitude et mes sincères remerciements.

Cette thèse étant le fruit d'un travail d'équipe, je tiens également à remercier :

Toute l'équipe du laboratoire d'Hémostase du C.R.T.S de Lille, pour son aide et sa sympathie.

Le personnel du service des prélèvements du C.R.T.S de Lille, pour leur compétence et leur bonne humeur.

Stéphane Bouquelet et son équipe, qui nous a généreusement fourni la β -galactosidase de Bifidobacterium.

Le groupe de recherche du laboratoire du Professeur Sixma à Utrecht, qui m'a accueilli et enseigné la technique de perfusion. Je remercie particulièrement Philipp de GROOT et Patricia NIEVELSTEIN pour leur amitié et leur dévouement.

Monsieur le Professeur DELECOUR, directeur de la maternité Salengro, et son personnel, qui avec complaisance et suivi, se sont chargés de nous fournir les cordons ombilicaux.

Madame Blandine Wittouck et Mademoiselle Christine Besson qui ont réalisé avec qualité et patience la frappe et la mise en page de ce mémoire.

INTRODUCTION

p. 1

GENERALITES

L'ADHESION PLAQUETTAIRE

p. 3

I - ETUDE "IN VIVO" DE L'ADHESION PLAQUETTAIRE

p. 3

II - TECHNIQUES D'ETUDE "IN VITRO" DE L'ADHESION PLAQUETTAIRE

p. 6

A. ADHESION AU SOUS-ENDOTHELIUM

p. 6

B. ADHESION AUX CONSTITUANTS PURIFIES

p. 8

C. ADHESION AU COLLAGENE

p. 9

- 1) Structure du collagène
- 2) Types de collagène du tissu vasculaire
- 3) Rôle du collagène dans l'adhésion plaquettaire
- 4) Rôle des glycanes dans l'adhésion plaquettaire
- 5) Domaine de fixation du vWF sur le collagène
- 6) Domaine de fixation de la plaquette sur le collagène

D. ROLE DES PROTEINES DU PLASMA ET DU SOUS-ENDOTHELIUM

p. 13

- 1) Rôle du facteur Willebrand
- 2) Rôle de la fibronectine
- 3) Rôle éventuel d'autres protéines

E. <u>ROLE DE LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE</u>	p. 15
1) Effet des modifications enzymatiques de la surface plaquettaire	
2) Thrombopathies plaquettaires associées à une anomalie de l'adhésion plaquettaire	

F. <u>INFLUENCE MEDICAMENTEUSE</u>	p. 17
1) Aspirine	
2) Autres anti-inflammatoires	
3) Actions d'autres substances sur l'adhésion plaquettaire	

LE FACTEUR WILLEBRAND

I - <u>BIOLOGIE MOLECULAIRE</u>	p. 19
II - <u>BIOSYNTHESE</u>	P. 21
III - <u>STRUCTURE DU vWF</u>	p. 21
IV - <u>TECHNIQUES D'ETUDES DU vWF</u>	p. 27
A. <u>DOSAGES IMMUNOLOGIQUES</u>	p. 27
B. <u>DOSAGE DU COFACTEUR DE LA RISTOCETINE</u>	p. 27
C. <u>REPARTITION MULTIMERIQUE DU vWF</u>	p. 28
D. <u>FIXATION DU vWF AUX PLAQUETTES</u>	p. 28
E. <u>LE SYSTEME DE PERFUSION "IN VITRO"</u>	p. 28
V - <u>DOMAINES FONCTIONNELS DU vWF</u>	p. 29
VI - <u>INTERACTION DU vWF AVEC LES PLAQUETTES</u>	p. 31

VII - <u>FIXATION DU vWF AU COLLAGENE</u>	p. 33
VIII - <u>ROLE DU vWF DANS L'ADHESION PLAQUETTAIRE</u>	p. 34
A. <u>ROLE DU vWF PLASMATIQUE</u>	p. 34
1) Adhésion des plaquettes au collagène	
2) Adhésion des plaquettes au sous-endothélium	
B. <u>ROLE DU vWF DU SOUS-ENDOTHELIUM</u>	p. 35
C. <u>IMPORTANCE DE LA STRUCTURE MULTIMERIQUE DU vWF DANS L'ADHESION PLAQUETTAIRE</u>	p. 35
IX - <u>ROLE BIOLOGIQUE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE DU vWF</u>	p. 36
A. <u>ETUDE DES CAS PATHOLOGIQUES</u>	p. 36
B. <u>UTILISATION DES GLYCOSIDASES</u>	p. 37
1) Utilisation des neuraminidases	
2) Action d'une β -galactosidase sur le vWF	
3) Action d'une β -galactosidase sur l'AS-vWF	
4) Utilisation de la galactose oxydase	
5) Utilisation d'endoglycosidases	
6) Actions de lectines sur le vWF	
7) Autres expériences	

TRAVAUX PERSONNELS

TECHNIQUES

I - <u>LE SYSTEME DE PERFUSION</u>	p. 42
A. <u>RAPPELS</u>	p. 42

B. <u>FACTEURS PHYSIQUES INFLUENCANT L'ADHESION PLAQUETTAIRE</u>	p. 42
C. <u>DESCRIPTION DU SYSTEME</u>	p. 44
1) La chambre de perfusion annulaire	
2) La chambre de perfusion rectangulaire	
D. <u>PREPARATION DES PERFUSATS</u>	p. 49
E. <u>LA PERFUSION</u>	p. 52
1) Mode opératoire	
2) Calcul du nombre de plaquettes fixées	
3) Calcul du pourcentage d'adhésion	
4) Calcul du pourcentage de fixation du vWF radiomarqué au collagène ou au sous-endothélium dans le système de perfusion	
5) Calcul statistique	
F. <u>CAUSES D'ERREURS</u>	p. 54
1) Liées au système de perfusion	
2) Liées à la technique en chambre annulaire	
3) Liées à la technique en chambre rectangulaire	
II - <u>FIXATION DU vWF AUX FIBRES DE COLLAGENE ("Binding collagen")</u>	p. 55
A. <u>LE COLLAGENE FIBRILLAIRE</u>	p. 55
B. <u>LA TECHNIQUE DU "BINDING COLLAGEN"</u>	p. 56
III - <u>AUTRES TECHNIQUES</u>	p. 56
<u>RESULTATS</u>	
I - <u>ETUDE DU ROLE DE LA COPULE GLYCANNIQUE DU vWF DANS L'ADHESION PLAQUETTAIRE</u>	p. 58
II - <u>EFFET INHIBITEUR DE DIFFERENTS ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE LE vWF, SUR L'ADHESION PLAQUETTAIRE</u>	p. 103

III - ETUDE DE LA CAPACITE DE DIFFERENTS CONCENTRES THERAPEUTIQUES, RICHES EN
FVIII, A INDUIRE L'ADHESION PLAQUETTAIRE

p. 124

C O N C L U S I O N G E N E R A L E

p. 146

ABREVIATIONS

Ac : anticorps,
AS vWF : asialo vWF (facteur Willebrand désialylé) = Neu ase vWF,
ADP: adénosine di-phosphate,
BH4K : borohydrure de potassium,
CNBr : bromure de cyanogène,
ConA : concanavaline A,
CP : cryoprécipité thérapeutique,
DEAE-Sepharose : Diéthylaminoéthyl Sepharose,
DTE : dithioérythritol,
EIA : dosage par immunoélectrophorèse,
ELISA : dosage immunoenzymatique,
Endo F : endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase (*Flavobacterium meningosepticum*),
FVIII : facteur VIII,
FVIII:C : activité procoagulante du facteur VIII,
Fuc : fucose,
Gal : galactose,
GalNAc : N-acetylgalactosamine,
Galase : β -galactosidase,
Galox : galactose oxydase
GlcNAc : N-acétylglucosamine,
GP : glycoprotéine,
GPIa : glycoprotéine plaquettaire Ia,
GPIb : glycoprotéine plaquettaire Ib,
GPIIb/IIIa : complexe glycoprotéique plaquettaire II-IIIa,
HPM : haut poids moléculaire,
Ig : immunoglobuline,
kDa : kilodalton,
KR : tampon Krebs Ringer,
Man : Mannose,
Neu ase : Neuraminidase,
Neu ase vWF : vWF désialylé,
(Neu-gal)ase vWF : vWF désialylé puis partiellement dégalactosylé,
PAS : coloration de Schiff à l'acide periodique,
PG E1 : prostaglandine E1,
PG I2 : prostaglandine I2,
PN : plasma normal,
PRP : plasma riche en plaquettes,

PNA : Peanut agglutinin,
RCA : Ricinus communis agglutinin,
RGDS : enchaînement de 4 acides aminés Arg-Gly-Asp-Ser,
RIA : dosage par radioimmunologie,
SD : solvant détergent,
SDS : sodium dodécyl sulfate,
SM : pâte de cryoprécipitation servant à la préparation des concentrés de FVIII,
SpI : fragment I obtenu par la protéase V8,
SpII : fragment II obtenu par la protéase V8,
SpIII : fragment III obtenu par la protéase V8,
StV8 : protéase V8 extraite de Staphylococcus aureus,
TNBP : Tri N butyl phosphate,
TS : temps de saignement,
TSP : thrombospondine,
U : unité. Par définition, 1 ml de plasma renferme 1 unité de vWF:Ag et de cofacteur de la ristocétine,
vWD : maladie de Willebrand,
vWF : facteur Willebrand,
vWF:Ag : antigène du facteur Willebrand,
vWF:RCO : activité cofacteur de la ristocétine du facteur Willebrand,
Y : vitesse de cisaillement.

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

L'étude des malades souffrant de manifestations hémorragiques a permis de montrer que chez certains d'entre eux il existe un trouble de l'hémostase dite primaire (c'est-à-dire l'ensemble des phénomènes physiologiques qui aboutissent à la formation d'un thrombus plaquettaire au niveau de la lésion de la paroi vasculaire), dû à l'absence ou à la modification d'une glycoprotéine plasmatique appelée facteur Willebrand (vWF).

La seule mesure de l'activité fonctionnelle du vWF a été, pendant de nombreuses années, le test d'agglutination des plaquettes en présence d'un antibiotique, la ristocétine. Cette agglutination, proportionnelle à la quantité de vWF n'est cependant pas toujours corrélée à l'activité physiologique du vWF. D'autres tests "in vitro" ont également montré que le vWF était capable de se fixer, d'une part, à la plaquette en présence de ristocétine ou de thrombine et, d'autre part, à des constituants du sous-endothélium, comme les fibres de collagène. L'ensemble de ces constatations a laissé supposer un rôle important et multifonctionnel du vWF dans l'hémostase primaire. Il est apparu néanmoins que ces différents tests, dont chacun fait apparaître une fonction précise du vWF dans des conditions fort éloignées des conditions de flux de la circulation sanguine, ne permettent pas de bien étudier le rôle physiologique du vWF dans la première étape de l'hémostase primaire, qu'est l'adhésion plaquettaire.

C'est en 1972 que Baumgartner et al. ont mis au point un système d'étude de l'adhésion plaquettaire fondé sur des perfusions de sang, permettant de reproduire les conditions hémodynamiques de la circulation sanguine. Ce système leur permit d'étudier précisément les mécanismes aboutissant à l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium, et de montrer, notamment, que l'adhésion plaquettaire est dépendante du facteur Willebrand à des vitesses de cisaillement identiques à celles de la microcirculation. On comprend ainsi qu'un déficit quantitatif ou qualitatif en vWF se traduise par une tendance hémorragique.

Au sein du laboratoire d'Hémostase du Centre de Transfusion de Lille, où, depuis de nombreuses années, on s'attache à étudier les relations structure-fonction du facteur Willebrand, nous avons été chargés de la mise au point des systèmes de perfusion de Baumgartner et al., (1972) et Sakariassen et al., (1983). En effet, cette technique était nécessaire pour apprécier "in vitro" l'activité fonctionnelle du facteur Willebrand et, en particulier,

mieux définir le rôle de la partie glycanique de ce facteur dans l'hémostase primaire.

Ce mémoire consistera dans un premier temps à faire le point bibliographique sur l'adhésion plaquettaire et sur le facteur Willebrand, puis, après avoir exposé les techniques développées au laboratoire pour ce travail, à présenter et discuter les résultats obtenus dans les trois voies d'études exposées ci-dessous :

* Comparaison de la capacité du facteur Willebrand purifié, natif ou modifié par des exoglycosidases, à induire l'adhésion plaquettaire.

* Recherche et étude des anticorps monoclonaux dirigés contre le facteur Willebrand et inhibiteurs de l'adhésion plaquettaire.

* Etude de l'aptitude de divers concentrés de FVIII à corriger l'adhésion plaquettaire

GENERALITES

L'ADHESION PLAQUETTAIRE

I - ETUDE IN VIVO DE L'ADHESION PLAQUETTAIRE

La lumière interne du vaisseau est tapissée par une monocouche de cellules endothéliales. La base de ces cellules est implantée sur la matrice sous-endothéliale (le sous-endothélium) composée de macromolécules dont les collagènes, les glycosaminoglycannes, la fibronectine (Fn), le facteur Willebrand (vWF), la thrombospondine (TSP), les microfibrilles. Ces constituants, généralement synthétisés par la cellule endothéliale constituent une surface thrombogène. L'autre pôle de la cellule endothéliale est sa face vasculaire, en contact avec le sang. Contrairement au sous-endothélium, qui n'est en contact avec le sang que lors d'une lésion vasculaire, l'endothélium n'active ni les plaquettes sanguines, ni le système de coagulation ; on dit qu'il est hémocompatible. (Fig.1)

Les plaquettes sont des cellules anucléées de 6 à 8 μm circulantes dans le sang, de forme discoïde et dérivées des mégacaryocytes médullaires. C'est l'interaction de la membrane plaquettaire avec le sous-endothélium qui induit l'adhésion plaquettaire. Cette première étape de l'hémostase a donc d'abord été étudiée par des expériences montrant les conséquences du contact des plaquettes avec le sous-endothélium.

Pour cela, on injecte à un animal (rat ou lapin) des plaquettes sanguines radiomarquées, puis on lèse une grosse artère par introduction d'un catheter. Après quelques temps de circulation sanguine, on peut soit compter sur le segment d'artère le nombre de plaquettes fixées, soit visualiser, par morphométrie, l'allure du thrombus formé. On a constaté ainsi que, lors d'une lésion vasculaire, le sous-endothélium devenait très rapidement recouvert d'une couche de plaquettes adhérentes. De par cette adhésion, qui est la phase initiale de l'hémostase, la plaquette change de forme, s'étale sur le sous-endothélium pour se fixer plus solidement, puis le contenu des granules alpha et des granules denses intraplaquettaires libéré (ADP, sérotonine, ...) cause l'agrégation plaquettaire, (Grove et al., 1979). La mise en oeuvre du système de coagulation, initié par l'activation des facteurs contact par le sous-endothélium, provoque la formation de fibrine qui stabilise les agrégats plaquettaires (Fig.2).

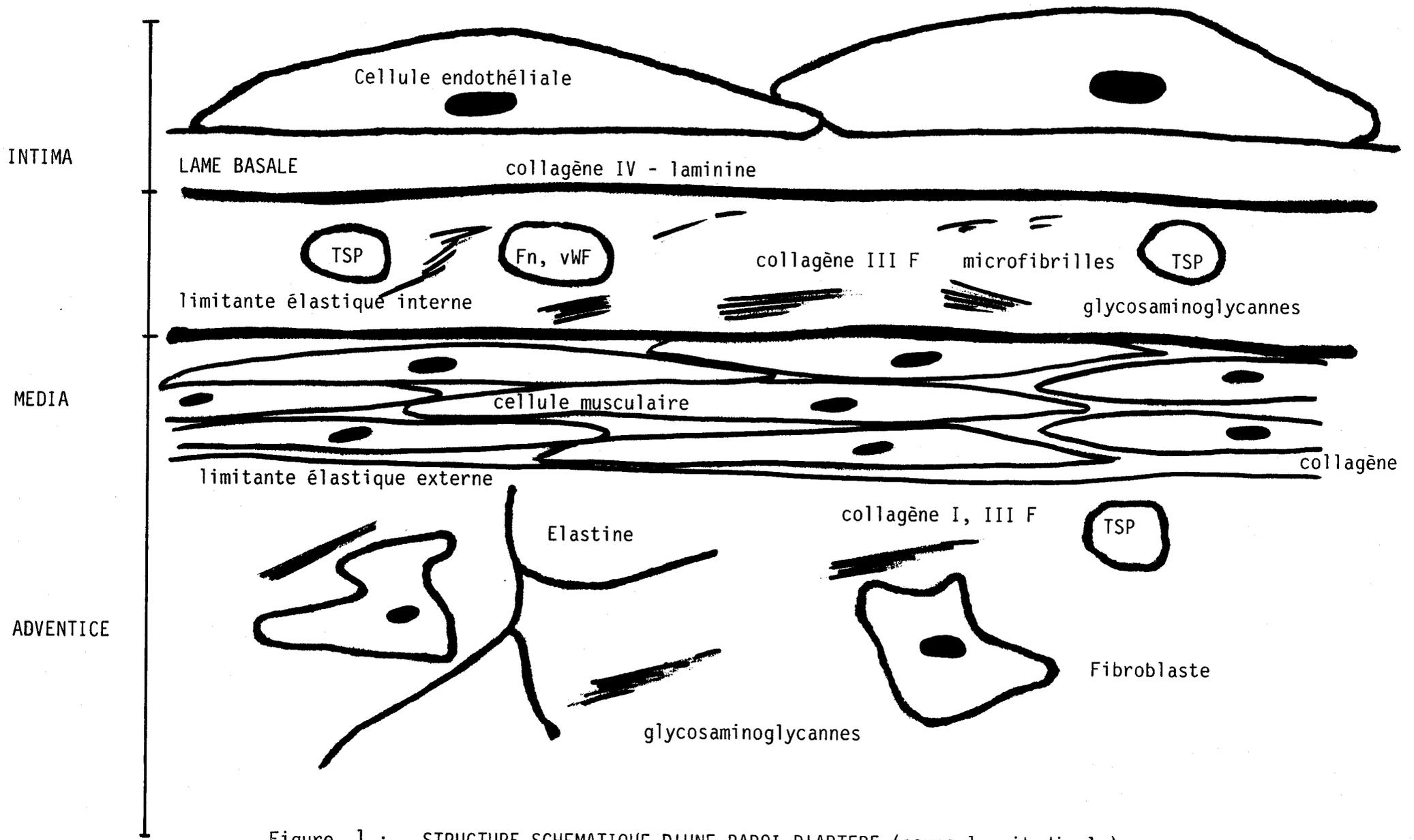


Figure 1 : STRUCTURE SCHEMATIQUE D'UNE PAROI D'ARTERE (coupe longitudinale)

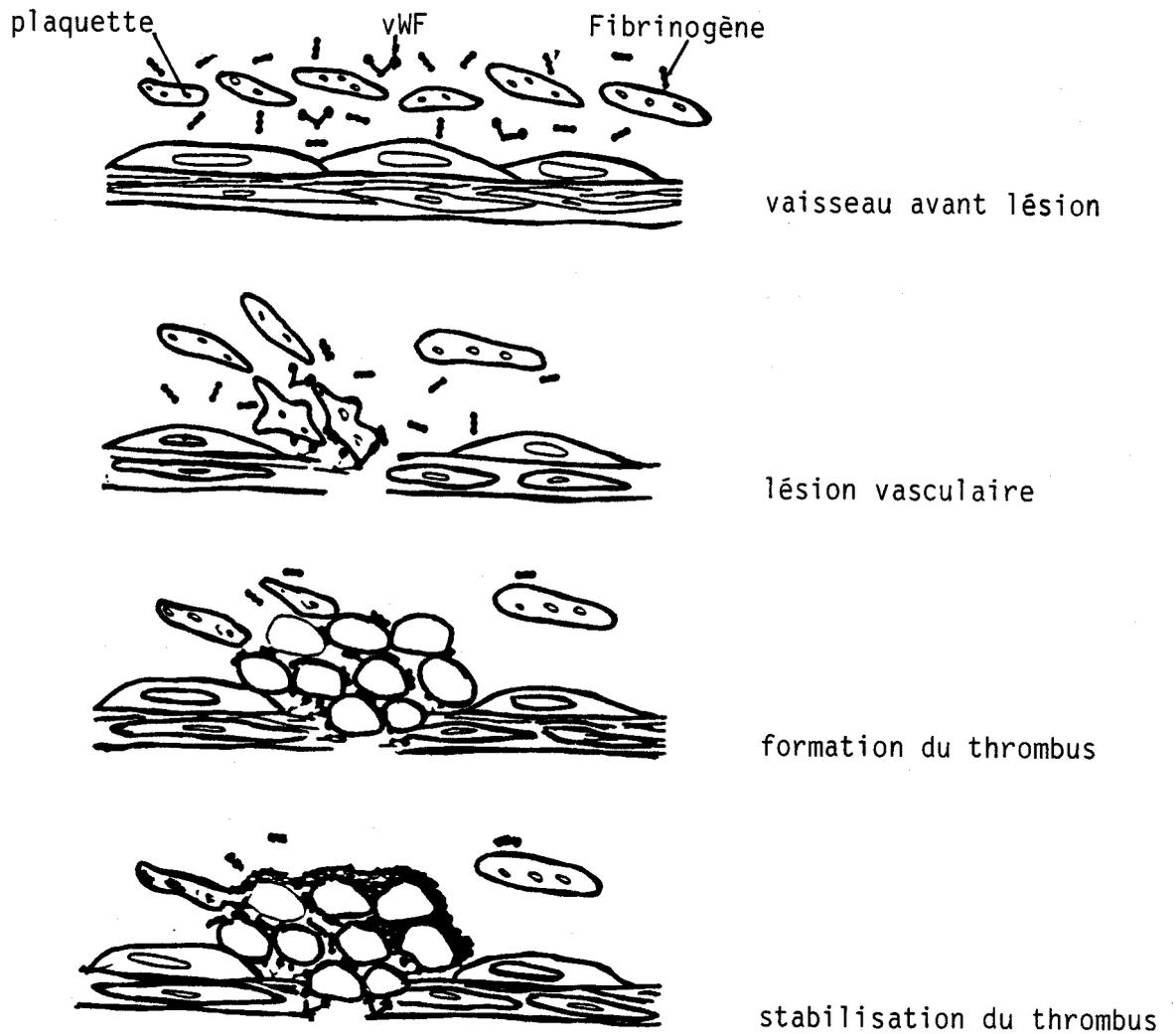


Figure 2 : FORMATION DU THROMBUS PLAQUETTAIRE
(d'après J. HAWIGER, Human pathology, 1, 112, 1987)

Cependant, ce système d'étude ne permet pas d'étudier précisément les différents facteurs impliqués dans l'hémostase. De plus, les résultats des expérimentations animales ne sont pas directement transposables à l'homme. La mise en oeuvre d'un système "in vitro" a donc été nécessaire pour approfondir les connaissances dans le domaine de l'hémostase primaire et montrer notamment l'intervention des facteurs plasmatiques dans l'adhésion plaquettaire.

II - TECHNIQUES D'ETUDE "IN VITRO" DE L'ADHESION PLAQUETTAIRE

A. ADHESION AU SOUS-ENDOTHELIUM

L'adhésion des plaquettes au sous-endothélium a été étudiée dans un système de perfusion "in vitro" adapté pour reproduire les conditions de circulation existant "in vivo" lors d'une lésion vasculaire (Baumgartner et al., 1972). Dans ce système un segment d'artère ombilicale déendothélialisée est exposé à un flux constant de sang citraté reconstitué. Différents paramètres peuvent être modifiés comme la composition du perfusé, la vitesse du flux et le temps de perfusion.

Ce système est composé d'une pompe péristaltique, d'un entonnoir, d'une chambre de perfusion cylindrique et d'un réservoir contenant le perfusé (Fig.3). L'ensemble est maintenu à 37 °C par un bain marie régulé. Une tige centrale dans la chambre de perfusion porte un segment d'artère aortique de lapin, (Baumgartner et al., 1972) ou ombilicale humaine (Sakariassen et al., 1984), retournée en doigt de gant. Le flux de sang aspiré du réservoir par la pompe péristaltique est régulé par un entonnoir. Ainsi par gravité, le sang arrive dans la chambre de perfusion d'une façon régulière et continue, puis retourne dans le récipient de départ. Dans ce système en circuit fermé, les temps de perfusion sont en général de 3 à 5 minutes. Pour faire varier la vitesse de flux, on doit modifier le débit et donc la position de l'entonnoir.

Des études morphométriques, faites après passage du sang sur l'artère permettent de visualiser les plaquettes fixées au sous-endothélium. On distingue ainsi les plaquettes fixées en 3 grandes classes :

- Les plaquettes de contact "C"

La phase de contact représente la phase initiale de fixation de la plaquette sur le sous-endothélium. La plaquette est ponctuellement attachée et non intimement liée au sous-endothélium.

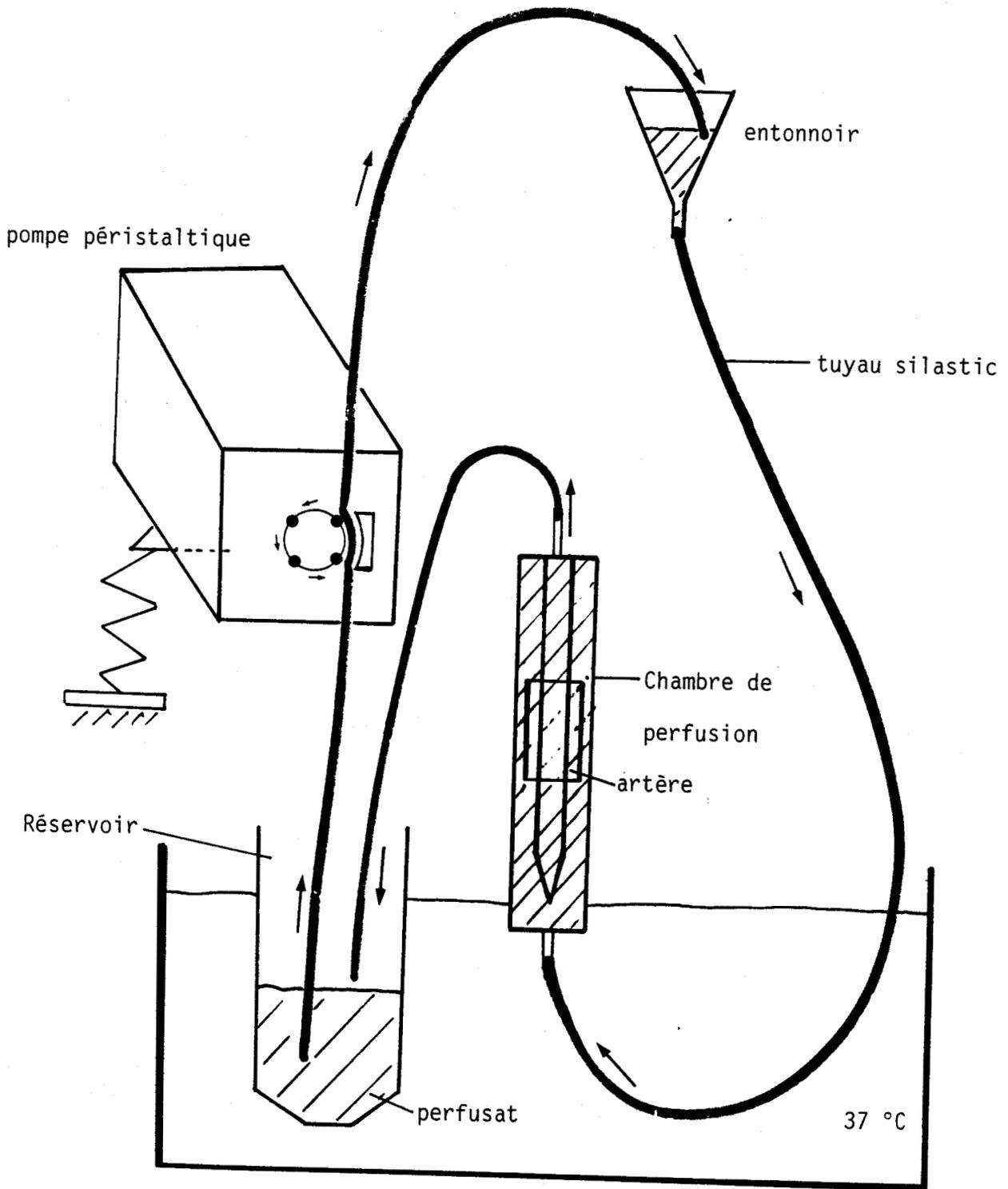


Figure 3 : LE SYSTEME DE PERFUSION EN CHAMBRE ANNULAIRE

- Les plaquettes étalées "E"

Cette phase d'étalement permet à la plaquette de se fixer plus solidement au sous-endothélium grâce à son changement de forme et à la formation de pseudopodes. Cette étape précède l'étape d'interaction plaquette-plaquette.

- Les thrombi

L'interaction plaquette-plaquette résulte en la formation d'agrégats plaquettaires. En général, seuls les agrégats d'une hauteur supérieure à 5 μm sont pris en compte.

Des études morphométriques permettent d'étudier, d'une part l'adhésion plaquettaire au sens strict, c'est-à-dire les plaquettes de contact et les plaquettes étalées, et d'autre part la phase ultérieure d'agrégation plaquettaire. Cependant, étant donné que la durée de perfusion est courte, le phénomène d'agrégation reste limité.

Cependant, bien que l'utilisation d'une artère humaine augmente la signification physiologique des résultats et permette de faire des études morphométriques, nous verrons plus loin que les constituants du vaisseau ont un rôle important dans l'adhésion plaquettaire et de ce fait peuvent masquer une éventuelle anomalie du plasma étudié. Il s'avère ainsi parfois nécessaire de travailler dans un système analogue mais où le fragment d'artère est remplacé par un support recouvert d'un constituant purifié du sous-endothélium ou d'une matrice extracellulaire de cellules endothéliales en culture.

B. ADHESION AUX CONSTITUANTS PURIFIES DU SOUS-ENDOTHELIUM

Le système d'adhésion aux constituants purifiés nécessite une chambre de perfusion différente de celle utilisée par Baumgartner. Ce type de chambre a été développé par Sakariassen et al., (1983) sous le nom de chambre rectangulaire. Dans cette chambre de perfusion, il est possible d'insérer des lamelles de microscope sur lesquelles on a préalablement pulvérisé des constituants purifiés du sous-endothélium.

En effet, les plaquettes sont capables de se fixer à divers constituants du sous-endothélium comme les fibres de collagène, la membrane basale, l'élastine. Par contre, les composants comme les fibres élastiques, les protéoglycannes ne permettent pas la fixation des plaquettes, (Baumgartner et al., 1976). Les divers types de collagène présents au niveau du

sous-endothélium sont faciles à extraire et c'est pourquoi le collagène est le principal constituant utilisé dans les systèmes de perfusion. D'autres constituants du vaisseau, par contre, comme les microfibrilles ne peuvent pas être utilisés puisqu'il est techniquement impossible de les pulvériser uniformément, (Fauvel et al., 1983).

Grâce à ce système, on peut d'une part comparer la capacité de divers constituants du sous-endothélium comme par exemple les différents types de collagène, à induire l'adhésion plaquettaire, et d'autre part, mettre en évidence un défaut même mineur des constituants plasmatiques impliqués dans l'adhésion plaquettaire. Ainsi, en utilisant du collagène purifié, on peut déceler une anomalie ou une diminution modérée du vWF plasmatique, puisque ce facteur, important dans l'adhésion, n'est introduit dans le système que sous sa forme plasmatique. Par contre dans le système de Baumgartner, le vWF du sous-endothélium de l'artère normale peut masquer un déficit plasmatique.

C. ADHESION AU COLLAGENE

1) Structure du collagène

Le collagène est la protéine majeure de la matrice extra-cellulaire. Il est synthétisé par la cellule endothéliale et le fibroblaste. La principale caractéristique de toutes les molécules de collagène est leur structure hélicoïdale à trois brins. Trois chaînes polypeptidiques de collagène appelées chaîne α sont enroulées les unes autour des autres, en une hélice régulière pour former une molécule d'environ 300 nm de long et de 1.5 nm de diamètre. Cette hélice est appelée collagène monomérique ou tropocollagène, (Jaffe, 1976) (Fig.4).

Sept formes de chaînes, d'environ 1 000 acides aminés ont pu être distinguées : α_1 (I), α_1 (II), α_1 (III), α_1 (IV), α_1 (V), α_2 (I) et α_2 (V).

Les principaux types de collagène sont appelés type I, II, III, IV, V. Ils diffèrent par leur composition et séquence en acides aminés ainsi que par leur partie glycanique, (Santoro et Cunningham, 1981). Au niveau du vaisseau, on rencontre essentiellement les types I, III, IV et V.

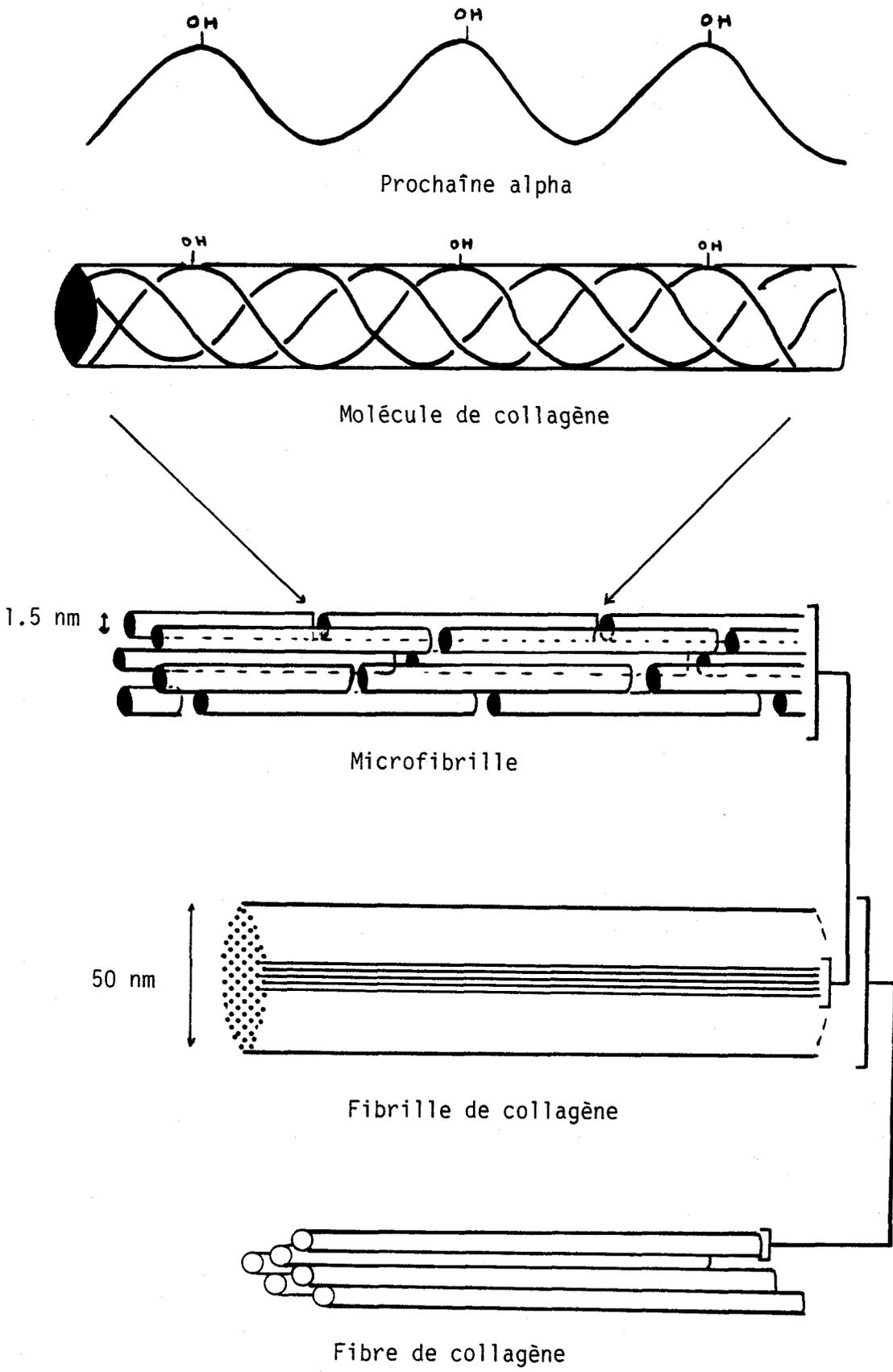


Figure 4 : FORMATION DE LA FIBRE DE COLLAGENE

2) Principaux types de collagène du tissu vasculaire

type	chaîne	Localisation	Capacité à induire l'adhésion plaquettaire
I	$[\alpha_1(I)]_2 \alpha_2(I)$	Adventice, Media	oui
III	$[\alpha_1(III)]_3$	Media, Adventice	oui
IV	$[\alpha_1(IV)]_3$	Membrane basale	controversée
V	$[\alpha_1(V)]_2 \alpha_2(V)$	disséminée (en petites quantités)	controversée

Après leur sécrétion dans l'espace extracellulaire, les molécules de collagène des types I et III s'assemblent en polymères ordonnés grâce à des liaisons intermoléculaires. Ces microfibrilles de 10 à 30 nm de diamètre, visibles en microscopie électronique, sont souvent groupées en faisceaux plus importants par multimérisation (Muggli et Baumgartner, 1973) pour former les fibres de collagène mesurant plusieurs micromètres de diamètre et observables en microscopie photonique. (Fig.4).

Par contre, les molécules de collagène type IV (qui constituent la majeure partie du collagène de la membrane basale) et du type V ne forment pas de fibrilles. Leur arrangement dans les tissus est encore mal connu.

3) Rôle du collagène dans l'adhésion plaquettaire

L'adhésion des plaquettes au sous-endothélium digéré par l' α -chymotrypsine a montré que les fibres de collagène du sous-endothélium étaient impliquées dans l'adhésion plaquettaire.

En système purifié, il a été montré que les collagènes purifiés de type IV et de type V, qui ne sont pas fibrillaires, ne permettent pas l'adhésion des plaquettes dans le système de perfusion. De plus, des anticorps

monoclonaux dirigés contre ces deux types de collagènes n'induisent pas d'effet inhibiteur sur l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium (Parson et al., 1986, Houdijk et al., 1983). Par contre, les plaquettes adhèrent aux collagènes de type I et de type III qu'ils soient sous forme fibrillaire ou non fibrillaire. Cependant, sous forme non fibrillaire, on observe une forte diminution des agrégats plaquettaires, (Houdijk et al., 1985a). Dans le processus complexe de l'hémostase primaire, le collagène apparaît impliqué, d'une part dans la fixation de la plaquette au sous-endothélium, cette adhésion étant dépendante du vWF à haute vitesse de cisaillement, et, d'autre part, dans l'activation plaquettaire nécessaire à la formation de thrombus.

4) Rôle des glycanes dans l'adhésion plaquettaire

Les glycanes du collagène (lactose) ne semblent pas nécessaires à l'adhésion des plaquettes, (Jaffe, 1976, Santoro et Cunningham, 1977, Puett et al., 1972) ou, plus exactement, le site du collagène nécessaire à l'interaction avec les plaquettes ne semble pas faire intervenir la fraction glycanique du collagène.

5) Domaine de fixation du vWF sur le collagène

La séquence du collagène impliquée dans l'adhésion plaquettaire n'est pas encore réellement connue. Cependant, à partir de la chaîne α du collagène III, Legrand et al. (1981) ont isolé, par coupure chimique au CNBr, un peptide de 149 acides aminés, dont la dégradation enzymatique donne un nonapeptide (Gly- Lys- OHPro- Gly- Glu- OHPro- Gly- Pro- Lys-) capable d'inhiber l'adhésion des plaquettes à la chaîne α III.

L'importance de la région télopeptidique du collagène dans l'adhésion plaquettaire n'a pas encore été envisagée. On sait simplement que cette région télopeptidique du collagène monomérique est importante dans la formation des fibres du collagène, (Chesney et al., 1979).

6) Domaine de fixation de la plaquette sur le collagène

Différentes glycoprotéines plaquettaires sont présumées être les récepteurs du collagène, permettant ainsi la fixation de la plaquette au collagène sans l'intervention du vWF. Les plaquettes de malades atteints de la dystrophie hémorragique de Bernard-Soulier qui ont un déficit en GpIb, ont une adhésion plaquettaire au sous-endothélium très réduite, (Weiss et al., 1974).

On pourrait donc se demander si la GpIb ne serait pas un récepteur du collagène présent au niveau du sous-endothélium. Cependant, cette hypothèse a été réfutée car ces plaquettes agrègent en présence de collagène. Il semble donc que la GpIb ne soit pas le récepteur du collagène (Hoyer, 1976), mais qu'elle soit proche de celui-ci, (Ruan et al., 1987).

- La glycoprotéine IIb, (Shadle et al., 1984) ainsi qu'une protéine de 60 kDa, (Shadle et Barondes, 1984) ont également été citées comme des récepteurs éventuels du collagène montrant ainsi que plusieurs récepteurs pourraient être impliqués dans l'interaction plaquette-collagène (Kotite et Cunningham, 1986).
- Cependant, des travaux récents, (Nieuwenhuis et al., 1986) ont montré, à partir de l'étude d'une malade avec syndrome hémorragique, que l'absence en glycoprotéine Ia (GpIa) s'accompagne d'un défaut d'adhésion et d'agrégation des plaquettes au collagène. La GpIa serait donc un récepteur du collagène.

D. ROLE DES PROTEINES DU PLASMA ET DU SOUS ENDOTHELIUM

1) Rôle du facteur Willebrand

Le facteur Willebrand a un rôle important dans l'adhésion plaquettaire. Ce rôle sera explicité dans le chapitre consacré au vWF (p.34).

2) Rôle de la fibronectine

a) Rôle de la fibronectine dans l'adhésion des plaquettes au collagène

La fibronectine (Fn) est une glycoprotéine dimérique plasmatique et tissulaire d'une masse moléculaire de 440 kDa. Sa concentration plasmatique est de 250 à 600 µg/ml. En 1978, Hynes et al., (1978) suggèrent que la Fn est importante dans l'adhésion des plaquettes au collagène, puis d'autres travaux, (Grinnell et al., 1979), (Kotelianski et al., 1981) montrent le rôle de la Fn dans l'étalement des plaquettes sur des surfaces recouvertes de collagène. L'étude précise du rôle de la Fn dans l'hémostase primaire a été effectuée grâce au système de perfusion "in vitro" développé par Sakariassen, (Houdijk et al., 1985 a). Dans ce système, lorsque le plasma utilisé est dépourvu de Fn, l'adhésion des plaquettes au collagène monomérique de type I et de type III est fortement diminuée à des vitesses de cisaillement comprises entre 490 et

1 300 sec⁻¹. Si l'on ajoute à ces plasmas de la Fn purifiée, à des concentrations plasmatiques, l'adhésion plaquettaire est restaurée, (Houdijk et al, 1985 a). Par contre, cette diminution n'est pas observée sur collagène fibrillaire, puisque d'après les auteurs, l'activation de la plaquette par la fibre de collagène provoque une libération de Fn suffisante pour induire l'adhésion plaquettaire.

Houdijk et al., (1985 a), ont montré que la Fn joue un rôle en se fixant sur le collagène puisque des expériences dans lesquelles les lamelles de collagène sont préincubées avec la Fn puis mises en présence d'un perfusat sans Fn donnent une adhésion plaquettaire normale.

Considérant le rôle complémentaire de la Fn et du facteur Willebrand, il semble que leur site de fixation au collagène soit différent.

b) Rôle de la Fn plasmatique dans l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium

La Fn plasmatique ne semble pas nécessaire à l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium puisque la perfusion d'un plasma normal et d'un plasma dépourvu de Fn induisent une adhésion plaquettaire similaire au sous endothélium.

c) Rôle de la Fn du sous-endothélium

La Fn a été mise en évidence au niveau du sous-endothélium par une technique d'immunofluorescence. A haute vitesse de cisaillement, l'adhésion plaquettaire n'est pas diminuée lorsque le plasma est dépourvu de Fn. Par contre, si l'on incube le sous-endothélium avec un antiserum de lapin dirigé contre la Fn humaine, l'adhésion plaquettaire est diminuée essentiellement à haute vitesse de cisaillement, (Houdijk et Sixma, 1985 b). Ceci montre que la Fn du sous-endothélium est suffisante pour induire l'adhésion plaquettaire.

3) Rôle éventuel d'autres protéines

a) Protéines plasmatiques autres que le vWF et la Fn

La perfusion de sang reconstitué avec du plasma normal ou une solution d'albumine humaine à 4 % contenant du vWF (1 U vWF:Ag/ml) et de la fibronectine (200 µg/ml) induit une adhésion plaquettaire normale au collagène

humain fibrillaire ou non fibrillaire de type III, (Houdijk et al., 1985 a). Ceci tend à prouver que seuls le vWF et la Fn sont impliqués dans l'adhésion des plaquettes.

b) Protéines du sous-endothélium

La thrombospondine (TSP) a été visualisée par immunofluorescence au niveau de la matrice extracellulaire. Cependant, la préincubation de cette matrice avec différents antisérums dirigés contre la thrombospondine n'inhibe pas l'adhésion des plaquettes à des vitesses de cisaillement comprises entre 100 et 1 300 sec^{-1} , (Houdijk et al., 1986 a). D'autres équipes, au contraire, démontrent que la thrombospondine joue un rôle dans l'adhésion des plaquettes et qu'elle serait impliquée dans la pathologie des phénomènes adhésifs des plaquettes, (Tuszynski et al., 1987).

Le nidogène et la laminine qui sont également localisés au niveau du sous-endothélium sont certainement impliqués dans l'adhésion plaquettaire, (Ill et al., 1984). Cependant, peu d'études se sont encore portées sur ce sujet.

E. ROLE DE LA MEMBRANE PLAQUETTAIRE

La membrane plaquettaire est en contact avec le sang. Elle possède des récepteurs pour certaines molécules du milieu plasmatique ; ces récepteurs sont essentiellement des glycoprotéines dont la partie glucidique est orientée vers l'extérieur.

Quelques unes de ces glycoprotéines impliquées dans l'hémostase primaire sont identifiées et leurs propriétés biologiques sont également développées dans les chapitres traitant du collagène (p. 12) et du facteur Willebrand (p. 31).

1) Effet des modifications enzymatiques de la surface plaquettaire

L'action d'enzymes protéolytiques sur les plaquettes, (Cazenave et al., 1978 b), et plus particulièrement l'action de la trypsine (Lahav et Meyer, 1981) réduit leur capacité à adhérer au collagène et au sous-endothélium dans un système de perfusion contenant du vWF.

Si on retire 50 % de l'acide sialique plaquettaire, l'adhésion des

plaquettes au collagène et au sous-endothélium n'est pas modifiée ; seule une faible augmentation de l'agrégation induite par le collagène est observée (Greenberg et al., 1975). Par contre, en oxydant les résidus d'acide sialique terminaux par le periodate, on diminue l'adhésion des plaquettes au collagène et au sous-endothélium, (Cazenave et al., 1976).

Il a été rapporté qu'une anomalie des glycanes des glycoprotéines et glycolipides de la membrane plaquettaire est observée chez les urémiques. Cette anomalie, mise en évidence par une diminution de la fixation de lectines spécifiques de la N-acétylgalactosamine, du glucose et du mannose sur la membrane plaquettaire, semble être en relation avec une diminution de l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium (Manso et al., 1985).

2) Thrombopathies plaquettaires associées à une anomalie de l'adhésion plaquettaire

Certaines thrombopathies dues à une anomalie des récepteurs glycoprotéiniques plaquettaires se caractérisent par un défaut de l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium.

Ainsi, l'absence de glycoprotéine Ib (GpIb) observée chez les sujets atteints de la maladie de Bernard-Soulier induit une diminution de l'adhésion plaquettaire à des vitesses de cisaillement supérieures à 500 sec^{-1} . En terme de répartition plaquettaire, toutes les formes de plaquettes adhérentes sont diminuées, (Baumgartner et al., 1977, Weiss et al., 1978b, Weiss et al., 1974). De même l'adhésion des plaquettes normales au sous-endothélium est diminuée en présence d'anticorps anti-GpIb, (Ruan et al., 1981). Il a été montré cependant que les plaquettes de Bernard-Soulier ont un déficit en d'autres glycoprotéines plaquettaires comme la GpV, une glycoprotéine de 17 kDa, ce qui explique certaines différences observées en adhésion plaquettaire entre des plaquettes de Bernard-Soulier et des plaquettes normales incubées avec un anticorps monoclonal anti GpIb, (Sakariassen et al., 1986 b).

En revanche, le défaut en GpIIb et IIIa lié à la maladie de Glanzmann n'induit que quelques perturbations de l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium, (Tschopp et al., 1975), (Baumgartner et al., 1977) puisque l'étude morphométrique montre une augmentation des plaquettes de contact à toutes vitesses de cisaillement ainsi qu'une diminution des plaquettes étalées au dessus de $1\ 000 \text{ sec}^{-1}$ et une absence d'agrégats entre 300 et

1 500 sec⁻¹, (Sakariassen et al., 1986 b). Le défaut d'étalement des plaquettes déficientes en GpIIb IIIa a d'ailleurs été rapporté par d'autres équipes, (Weiss et al., 1986). Toutefois, des expériences récentes ont montré que des peptides de synthèse contenant la séquence RGD (qui ferait partie du domaine de fixation du vWF sur les GpIIb IIIa) étaient inhibiteurs de l'adhésion des plaquettes au collagène et diminueraient fortement la formation de thrombus plaquettaire, (Fressinaud et al., 1987). Néanmoins, il serait nécessaire de savoir quels types de plaquettes (contact, étalées, thrombus) sont diminuées pour comparer ces résultats à ceux des autres expériences citées plus haut.

F. INFLUENCE MEDICAMENTEUSE

Dans ce paragraphe, nous traiterons brièvement des différents facteurs pouvant induire une diminution ou une augmentation de l'adhésion plaquettaire.

1) Aspirine

Certains auteurs ont montré que l'adhésion plaquettaire était inhibée par l'aspirine, (Sheppart et al., 1972). L'aspirine inhibe la cyclo-oxygénase plaquettaire qui permet la formation de thromboxane A₂ (un inducteur de l'agrégation plaquettaire) mais inhibe d'autre part la cyclo-oxygénase vasculaire qui permet la formation de la PGI₂ qui, elle, limite la croissance du thrombus plaquettaire. En fait, des études plus approfondies font apparaître que l'aspirine inhibe la formation du thrombus plaquettaire mais n'a pas d'effet sur la fixation même de la plaquette au sous-endothélium (Cazenave et al., 1978 (a)).

En sang total citraté, Weiss confirme, dans le système de perfusion selon Baumgartner, que l'aspirine n'inhibe pas l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium, bien qu'un léger effet inhibiteur soit observé à haute force de cisaillement, (Weiss et al., 1981).

On peut donc dire que l'adhésion plaquettaire n'est pas inhibée par l'aspirine, sous les conditions de flux, d'hématocrite et d'anticoagulant généralement utilisées dans les systèmes d'étude in vitro.

2) Autres anti-inflammatoires

D'autres drogues anti-inflammatoires non stéroïdiennes comme l'indométhacine et le sulfinpyrazone, peuvent, sous certaines conditions, inhiber l'adhésion plaquettaire, (Cazenave et al., 1978c). La PGE1 a un effet inhibiteur de l'adhésion plaquettaire certainement dû à sa capacité à augmenter la concentration d'AMP cyclique plaquettaire, (Baumgartner et al., 1976, Cazenave et al., 1974, Cazenave et al., 1978 b). La prostacycline PGI2 produite par l'endothélium inhibe l'agrégation plaquettaire mais également l'adhésion plaquettaire au collagène et au sous-endothélium, (Cazenave et al., 1979, Karniguian et al., 1982). De hautes concentrations de PGE1 et PGI2 inhibent la libération du contenu des plaquettes de lapin qui ont adhéré mais cet effet n'est pas observé avec des plaquettes humaines, (Adelman et al., 1981, Cazenave et al., 1979). L'effet de la PGI2 est certainement très localisé, vu sa faible concentration circulante, son inhibition n'induit pas d'augmentation de l'adhésion plaquettaire.

L'action du dipyridamole sur l'adhésion plaquettaire est sujet à discussion. En effet, dans le même système de perfusion selon Baumgartner, certains auteurs ne trouvent pas d'effet inhibiteur, (Weiss et al., 1981) alors que, plus récemment, d'autres ont montré un effet inhibiteur du dipyridamole sur l'interaction plaquette sous-endothélium et plaquette-plaquette, (Escolar et al., 1985). Cet effet inhibiteur semble être confirmé par des essais cliniques car l'administration de dipyridamole avant intervention chirurgicale et de dipyridamole associé à l'aspirine, après l'opération, réduit les risques de thrombose artérielle.

3) Action de diverses substances sur l'adhésion plaquettaire

La nicotine et le monoxyde de carbone contenus dans la fumée de cigarette pourraient être à l'origine de l'augmentation des risques de lésion du vaisseau et de la diminution de la durée de vie des plaquettes chez le fumeur, (Fuster et al., 1981, Becker et al., 1979). La pression sanguine élevée peut être également un facteur de l'augmentation de l'adhésion plaquettaire chez les hypertendus, (Brook et al., 1985). De même, l'hypercholestérolémie favorisant les lésions du vaisseau est associée au développement de l'athérosclérose.

LE FACTEUR WILLEBRAND

Le facteur Willebrand (vWF) est une glycoprotéine qui joue un rôle important dans la première étape de l'hémostase primaire qu'est l'adhésion plaquettaire et qui sert également de protéine porteuse au facteur antihémophilique A, le facteur VIII (FVIII). Le vWF est synthétisé par les cellules endothéliales (Jaffe et al., 1974) et les mégacaryocytes (Sporn et al., 1985). Sa concentration plasmatique généralement exprimée en U/ml (par définition 1 ml d'un mélange de plasmas citratés normaux renferme 1 U de vWF) est de 5 à 10 $\mu\text{g/ml}$ (Marchesi et al., 1972, Legaz et al., 1973) et sa concentration plaquettaire de 0.34 U/ 10^9 plaquettes (Gralnick et al., 1986).

Le déficit quantitatif ou qualitatif en vWF induit un syndrome hémorragique appelé maladie de Willebrand (vWD). Cette maladie est la plus fréquente des maladies hémorragiques constitutionnelles, elle est de type autosomique, le plus souvent dominant. Les malades atteints de vWD ont un défaut de l'hémostase primaire, mais également un trouble de la coagulation lié au déficit associé en FVIII. Ceci se traduit principalement par un purpura cutané, et des hémorragies des muqueuses. En cas d'hémorragie ou avant intervention chirurgicale, les patients atteints de vWD doivent subir un traitement substitutif, constitué d'injection de plasma normal, de cryoprécipité ou de concentré de complexe FVIII/vWF, qui permet de pallier le déficit quantitatif ou qualitatif en vWF et également en FVIII.

I - BIOLOGIE MOLECULAIRE

Des progrès considérables ont été faits, ces toutes dernières années, dans la connaissance du vWF grâce à l'étude de la biologie moléculaire de ce facteur. En effet les méthodes chimiques classiques ne permettent pas de purifier et d'étudier facilement le vWF vu sa faible concentration plasmatique et sa multimérisation. De plus, la sous-unité du vWF est d'une masse moléculaire importante et il s'avérait compliqué d'en déterminer la séquence primaire complète. Le clonage du cDNA du vWF a permis de montrer que la molécule initialement codée a une masse moléculaire supérieure à celle de la sous-unité mature connue. Cette molécule appelée pro vWF est en fait composée de la sous-unité mature et de ce que l'on appelle l'antigène II du vWF (Fig 5). Le séquençage du cDNA du vWF a permis de déduire l'enchaînement des acides aminés du pro vWF et d'y différencier plusieurs domaines homologues (Fig.5).

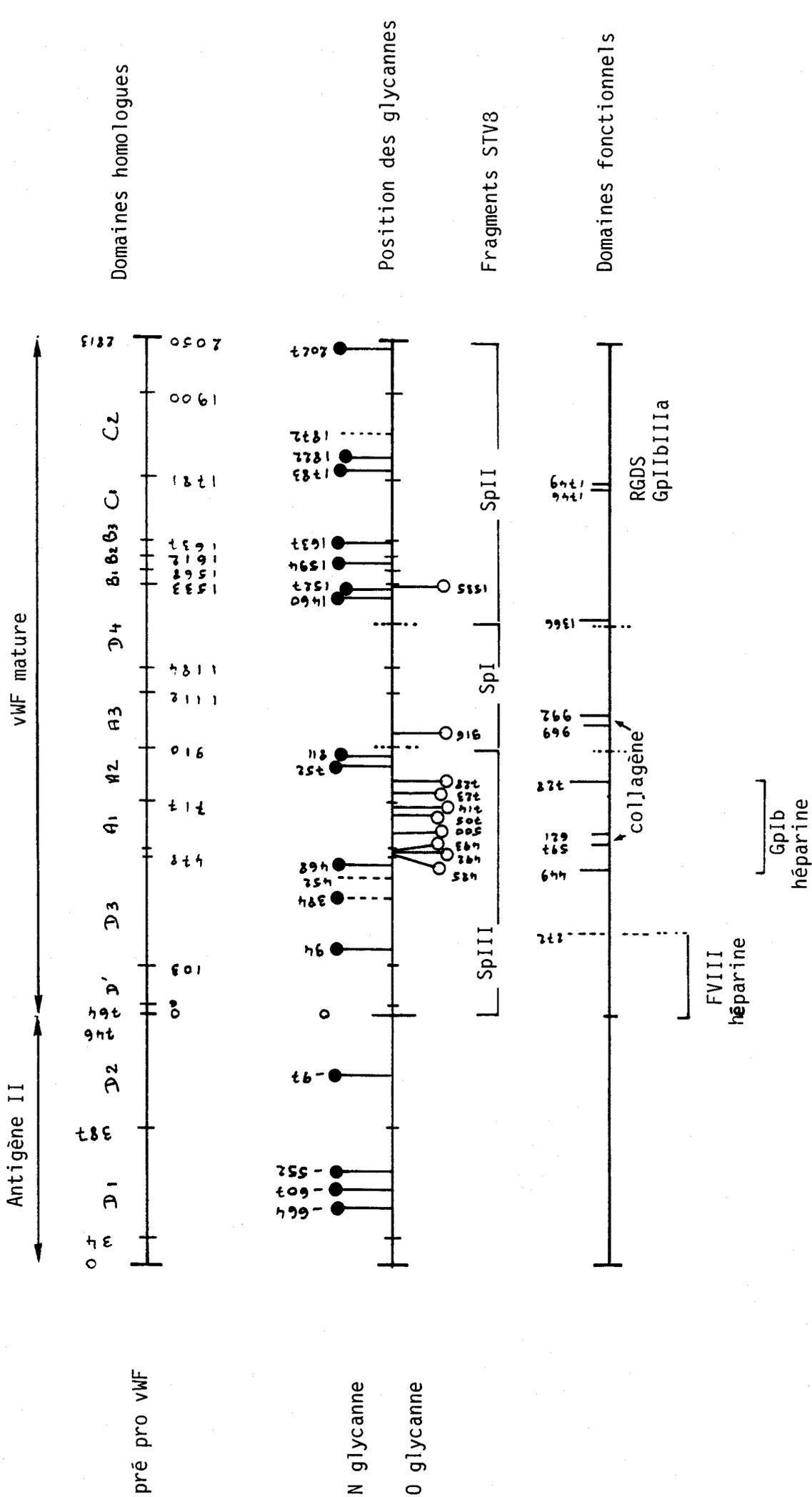


Figure 5 : STRUCTURE ET DOMAINES DE LA SOUS-UNITÉ DU VWF.

Il existe 17 sites potentiels de N-glycosylation dont 13 sont situés sur la sous-unité mature.

II - BIOSYNTHESE

En l'état actuel de nos connaissances, les principales étapes de la biosynthèse du vWF pourraient être schématisées comme nous le montrons sur la figure 6.

Le vWF est synthétisé par la cellule endothéliale (Jaffe et al. 1974) et le mégacaryocyte (Sporn et al., 1985). Le gène codant pour le vWF est porté par le chromosome 12 (Ginsburg et al., 1985). Le mRNA a une longueur de 8.5 à 9 kilobases code pour une protéine de 2 813 acides aminés d'une masse moléculaire de 309 kDa. La glycosylation de ce polypeptide conduit à une molécule d'une masse moléculaire d'environ 360 Kda appelée pré-pro-vWF.

Après l'hydrolyse du peptide signal du côté NH₂ terminal (22 acides aminés) le polypeptide se dimérise par formation de ponts disulfures du côté COOH terminal de chaque polypeptide. Ce dimère est le protomère du facteur Willebrand et a une masse d'environ 700 kDa (Fowler et al., 1985 b, Wagner et Marder, 1984).

Après l'hydrolyse de 741 acides aminés du côté NH₂ terminal (qui constituent une protéine circulante plasmatique appelée vWF antigène II (vW:AgII) également diminuée chez les sujets atteints de vWD mais dont les propriétés antigéniques sont distinctes de celles du vWF) le dimère se multimérise par formation de ponts disulfure du côté NH₂ terminal pour former le vWF mature. Des travaux de Verweij (Werweij et al., 1987) ont montré que le vW:AgII était impliqué dans le mécanisme de multimérisation. La partie NH₂ terminale du vWF mature ne contient pas de ponts disulfures puisque son hydrolyse par la plasmine ou la trypsine conduisant à la libération d'un peptide de 34 kDa n'a pas d'effet sur la structure multimérique du vWF (Sixma et al., 1984 b, Hamilton et al., 1985). A l'état mature, le vWF est secrété dans la circulation ou stocké dans les vésicules de Weibel Palade de la cellule endothéliale.

III - STRUCTURE DU vWF

Des études physicochimiques ont permis de déterminer le coefficient de sédimentation du vWF. Ce coefficient est de 16.4 pour le vWF

plasmatique et de 17.1 pour le vWF purifié après gel filtration. Cependant, le coefficient de sédimentation varie de 23 à 13 entre les premières et les dernières fractions obtenues après passage sur Sépharose CL2B, confirmant l'hétérogénéité du vWF (Barlow et al., 1984).

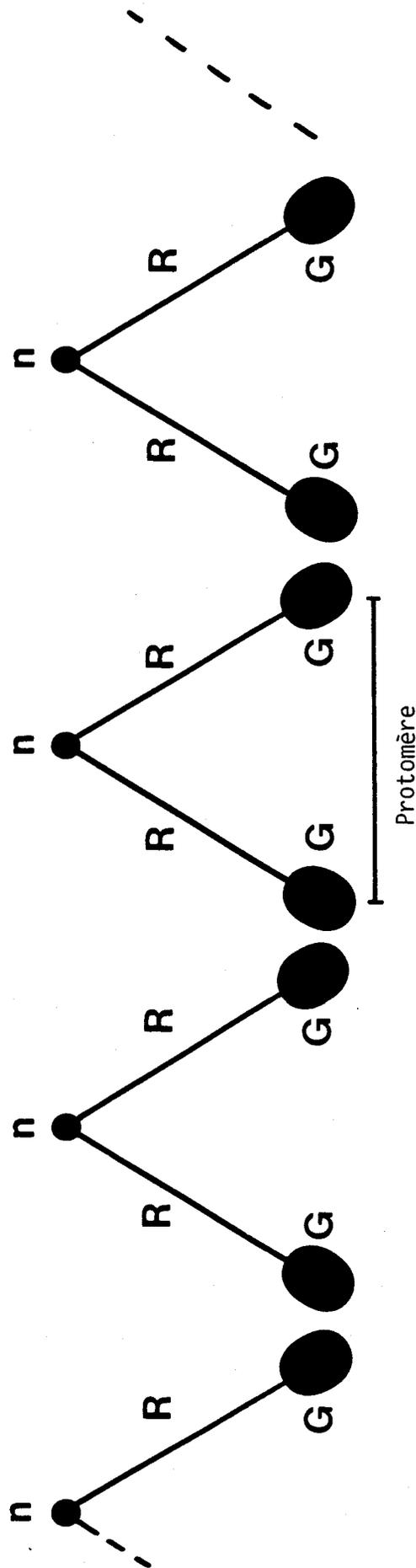
Les multimères du vWF ont été mis en évidence en électrophorèse sur gel d'agarose, tout d'abord à partir de vWF purifié. Cependant, depuis quelques années, une méthode sensible basée sur l'électrophorèse en agarose en présence de SDS et sur la détection consécutive du vWF par un anticorps radiomarqué anti-vWF, puis révélation par autoradiographie, a permis d'étudier le vWF plasmatique (Hoyer et Shainoff, 1980, Ruggeri et Zimmerman, 1981) et de confirmer sa distribution multimérique hétérogène. En effet le vWF plasmatique se révèle sous forme de nombreuses bandes dont la masse varie de 0.5 à 20×10^6 kDa (Van Mourik et Bolhuis, 1978, Perret et al., 1979).

Sur certains gels d'agarose à 2 %, chaque multimère apparaît sous la forme d'un "triplet" de 3 bandes (Ruggeri et Zimmerman, 1981) ou de "quintuplet" (Mazurier et al., 1986) qui ne peuvent s'expliquer par une simple polymérisation linéaire du protomère.

De récentes observations faites par microscopie électronique ont permis de caractériser le protomère du vWF. Ce protomère semble composé de 2 grands domaines globulaires G (22×6.5 nm) symétriquement connectés à un nodule plus petit n (6.4×3.4 nm) par l'intermédiaire de domaines allongés R (34×2 nm). On peut ainsi écrire l'enchaînement formant le protomère sous la forme GRnRG (Fowler et Fretto, 1985) (Fig.7). La masse moléculaire estimée de ce protomère (540 Kd) confirme que le protomère est un dimère de la sous-unité de 250 kDa. La multimérisation du vWF se ferait par le domaine G correspondant à la partie NH₂ terminale. On aurait alors l'enchaînement : (GRnRG) - (GRnRG) (Fig.7).

Le vWF natif est composé de 24 % de structure en hélice et 18 % en feuillet plissé β -sheet (Loscalzo et Handin, 1984).

La séquence complète des acides aminés du vWF a été publiée par Titani (Titani et al., 1986). Elle est déduite à la fois de l'analyse chimique directe des fragments CNBr de la protéine, et du séquençage du cDNA. Ainsi, on remarque que le vWF est riche en cystéines (8.3 % des acides aminés totaux) lesquels sont impliqués dans la formation de ponts disulfures puisque aucun groupement thiol libre n'est détectable. Cette distribution de la cystéine n'est pas homogène. En effet, deux régions principales du côté N-terminal (D'



R = "Rod domain"

G = "globular domain"

Figure 7 : STRUCTURE DU vWF OBSERVE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE D'APRES FRETTO et al. 1986

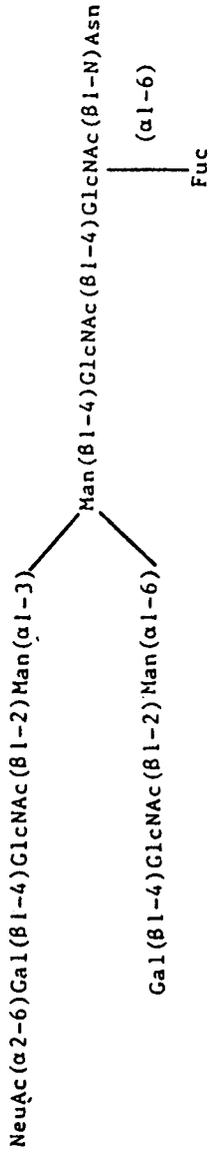
et D3) et du côté C-terminal (D4, B1, B2, B3, C1, C2) ont une très forte densité en cystéine. Ces deux régions sont séparées par un long segment qui en est presque dépourvu (Fig. 5 p. 20).

Par séquençage de protéine, l'emplacement de 12 N- et 10 O-glycannes a été déterminé (Titani et al., 1986). Ainsi sur les 13 sites potentiels trouvés sur la sous-unité mature, 2 ne sont pas utilisés et une Asn placée dans une séquence non usuelle de glycosylation (Asn - Ser - Cys) est, par contre, glycosylée (Fig.5). Les N-glycannes qui constituent environ 70 % de la copule glycanique du vWF (Samor et al., 1982), sont principalement composés (60 %) du biantenné monosialylé de type N-acétyl-lactosaminique (Debeire et al., 1983). De plus, Samor et al., (1986), ont isolé du vWF un glycanne tetraantenné de type N-acétyl-lactosaminique et un O glycanne majeur représentant 80 % des structures O glycaniques (Samor et al., 1987). Ces trois structures glycaniques du vWF sont représentées sur la figure 8.

O-GLYCANNE MAJEUR



N-GLYCANNE MAJEUR
BIANTENNE



N-GLYCANNE TETRAANTENNE

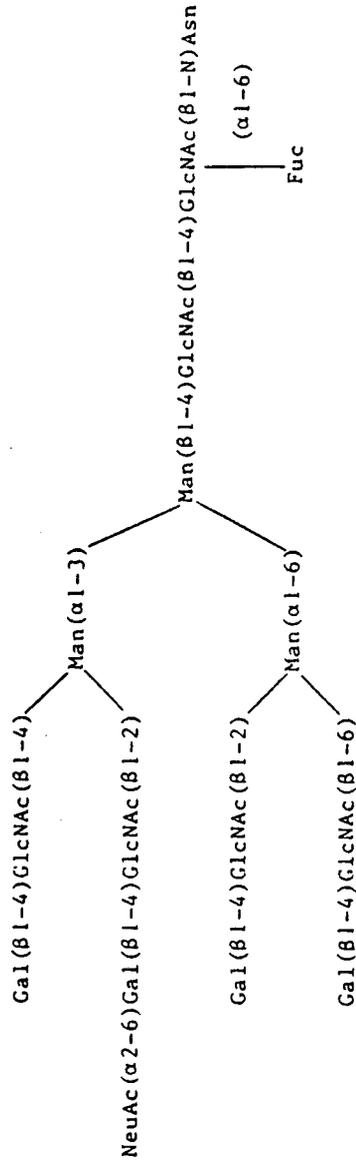


Fig. 8 : STRUCTURES CONNUES DES GLYCANNES DU VWF.

IV - TECHNIQUES D'ETUDE DU vWF

A. DOSAGES IMMUNOLOGIQUES

* La technique EIA de Laurell a été adaptée au dosage de l'antigène du vWF (Zimmerman et al., 1971). Sa sensibilité est cependant limitée (≈ 0.1 U/ml) et elle ne permet pas une bonne estimation de l'antigène du vWF des malades ayant une répartition multimérique anormale.

* La technique RIA (Paulssen et al., 1975) basée sur la révélation de l'antigène du vWF par un anticorps polyclonal radiomarqué est intéressante par sa sensibilité mais a le désavantage de l'utilisation de produits radioactifs.

* La technique sandwich type ELISA (Barlett et al., 1976) permet de doser l'antigène du vWF (vWF:Ag). Cette technique (Mazurier et al., 1977) est environ 65 fois plus sensible que la technique EIA classique et permet de détecter jusqu'à 0.0015 U/ml de vWF:Ag chez les patients vWD.

B. DOSAGES DU COFACTEUR DE LA RISTOCÉTINE

C'est Howard et Firkin (1971) qui les premiers ont constaté qu'en présence de ristocétine, un antibiotique proscrit pour son effet thrombopéniant, les plaquettes d'un plasma riche en plaquettes (PRP) de sujet normal s'agglutinent alors que chez un sujet vWD l'agglutination en présence de ristocétine (RIPA) est diminuée ou nulle, cette anomalie étant corrigée par adjonction de vWF exogène.

Ainsi, en utilisant différentes dilutions de plasma pauvre en plaquettes (PPP) de sujet normal, on peut établir des valeurs d'agglutination qui sont fonction du taux de vWF et permettent un dosage pseudofonctionnel du vWF. Ce dosage, de ce qu'il est convenu d'appeler le "cofacteur de la ristocétine", est basé sur le calcul de la vélocité d'agglutination (Weiss et al., 1973). La sensibilité de ce dosage est de l'ordre de 0.1 U/ml. Cette activité semble dépendante du degré de polymérisation du vWF. Cependant, on observe que dans certains cas de la maladie de Willebrand, il n'y a pas de corrélation entre Cofacteur de la ristocétine et temps de saignement.

C. REPARTITION MULTIMERIQUE DU vWF

L'électrophorèse en gel d'agarose en présence de SDS avec révélation en autoradiographie après contact avec des anticorps radiomarqués dirigés contre le vWF a permis de séparer et de visualiser les différents multimères du vWF (Hoyer et Shainoff, 1980, Ruggeri et Zimmerman, 1981). Cette technique a confirmé la distribution multimérique hétérogène du vWF et a permis de différencier les différents types de la maladie de Willebrand.

D'autres techniques électrophorétiques mettent en évidence l'existence de vWF normal protéolysé (Chopek et al., 1986, Zimmerman et al. 1986) indiquant que la sous-unité du vWF plasmatique n'est pas homogène.

D. FIXATION DU vWF AUX PLAQUETTES

La fixation du vWF aux plaquettes est une étape importante de l'hémostase primaire. Il est possible d'étudier "in vitro" cette étape en présence d'agents inducteurs comme par exemple, la ristocétine et la thrombine.

La ristocétine provoque la fixation du vWF sur les plaquettes (Zucker et al., 1977, Morisato et Gralnick, 1980). Cette fixation qui peut s'expliquer par un phénomène électrostatique (Coller et Gralnick., 1977) est indépendante du métabolisme plaquettaire et des ions calcium, et peut donc se faire avec des plaquettes formolées. Par contre, la fixation du vWF aux plaquettes en présence de thrombine est dépendante du métabolisme de la plaquette et des ions calcium.

Ces expériences de fixation du vWF aux plaquettes sont souvent appelées "binding" et peuvent se faire avec du vWF plasmatique ("binding" froid) ou du vWF purifié radiomarqué ("binding" chaud). Le "binding" chaud qui utilise en général du vWF purifié normal ou modifié est utilisé dans l'étude des mécanismes de la fixation du vWF aux plaquettes, et dans l'étude des patients souffrant de thrombopathies. Par contre, le binding froid est mieux adapté à l'étude du vWF des malades vWD.

E. LE SYSTEME DE PERFUSION IN VITRO :

Le système "in vitro" qui permet l'étude de l'hémostase primaire dans des conditions relativement proches de celles existant "in vivo" est

certainement le système de perfusion en chambre annulaire de Baumgartner et al., (1972) puisque ce système respecte les conditions hémodynamiques de la circulation sanguine. Ce système est détaillé page 6. D'autres systèmes de perfusion dérivés de celui de Baumgartner et al., (1972) ont été développés pour étudier l'adhésion des plaquettes à des composants purifiés du sous-endothélium ou sur des matrices extra-cellulaires (Sakariassen et al. 1983).

Ces systèmes de perfusion permettent une bonne approche du rôle biologique du vWF dans l'hémostase primaire et ont donc permis de mieux comprendre les mécanismes de l'hémostase primaire.

Bien que toutes les fonctions du vWF qui sont impliquées dans l'adhésion plaquettaire soient évaluées dans ce système, différents facteurs comme l'utilisation d'anticoagulant, le lavage et le marquage des plaquettes peuvent influencer l'adhésion des plaquettes et font que ce système peut encore être amélioré pour mieux reproduire les conditions de l'hémostase primaire.

V - DOMAINES FONCTIONNELS DU vWF

L'étude des propriétés biologiques des fragments de protéolyse et d'hydrolyse chimique (CNBr) du facteur Willebrand et de l'effet de différents anticorps monoclonaux a permis d'identifier différents domaines fonctionnels du vWF (Fig.5 p. 20).

* Le site de fixation du vWF sur la plaquette en présence de ristocétine se situe sur un fragment tryptique de 116 kDa. Après réduction, ce fragment donne un doublet de 53-55 kDa et fragment de 14 kDa (Sixma et al. 1984 b). Le doublet 53-55 kDa est encore reconnu par un anticorps monoclonal inhibiteur de la fixation du vWF à la GpIb plaquettaire en présence de ristocétine et de plus se fixe aux plaquettes en présence de ristocétine. Après hydrolyse enzymatique de sa partie glycanique, on obtient un fragment de 46 kDa qui est localisé entre les résidus 449 et 728 du vWF mature (Fujimura et al., 1986). Sur ce fragment on a localisé également le domaine de fixation du collagène et de l'héparine (Houdijk et al., 1986b), ces deux domaines étant différents du domaine de fixation à la GpIb. L'hydrolyse du vWF par la protéase V8 de *Staphylococcus aureus* (StV8) confirme que le domaine reconnu par la GpIb se situe à l'extrémité NH2t sur une partie de 170 Kd (Girma et al., 1986 a, Girma et al., 1986 b).

* Des sites de fixation du vWF au collagène se situent donc sur le fragment de 46 kDa vu ci-dessus. Un deuxième site collagène a été identifié sur un fragment trypsique de 48 kDa, et également sur le fragment SPI obtenu par hydrolyse du vWF par la StV8. Il se situe donc entre les résidus 911 et 1365 (Kalifatis et al., 1986).

* Le site de fixation du vWF aux plaquettes en présence de thrombine, donc sur le complexe GpIIb IIIa, est différent du site de fixation en présence de ristocétine (Houdijk et al., in press). En effet, après 24 h d'hydrolyse trypsique, 4 bandes (200, 155, 116, 85 kDa) sont immunoprécipitées par un anticorps monoclonal (vWF-9) inhibiteur de la fixation du vWF aux plaquettes en présence de thrombine. Le fragment 116 kDa obtenu donne après réduction 4 bandes de 54, 45, 30 et 21 kDa montrant ainsi qu'il est différent du 116 Kd impliqué dans la fixation des plaquettes en présence de ristocétine (Houdijk et al., 1986b, Girma et al., 1986a). Girma et al., 1986b ont ainsi pu montrer que le domaine de fixation à la GpIIb IIIa se trouvait sur un fragment de 42 kDa du côté COOH terminal. La séquence Arg-Gly-Asp (R-G-D) située entre les acides aminés 1743 et 1747 pourrait être impliquée dans le site de fixation du vWF à la GpIIb IIIa puisque cette fixation est inhibée par des peptides synthétiques qui contiennent cette séquence RGD commune à d'autres glycoprotéines (fibrinogène et fibronectine) qui se fixent également sur la GpIIb IIIa (Haverstick et al., 1985).

Dernièrement Niiya et al., (1987) ont identifié un fragment de 40 kDa issu de l'hydrolyse trypsique du fragment SpII et inhibiteur de la fixation du vWF sur les plaquettes stimulées à la thrombine. Il n'a pas été montré que ce fragment de 40 kDa dont le NH₂t est positionné sur l'acide aminé 1366, contenait la séquence RGDS (correspondant aux acides aminés 1744 à 1747) dans sa partie C-terminale. En effet, ce fragment, d'après sa localisation, pourrait certainement contenir 4 N-glycannes et 1 O-glycane et il semble donc peu probable, vu sa masse, que son COOH terminal soit positionné après l'acide aminé 1744.

* Le facteur VIII (Foster et al., 1987) et l'héparine (Fretto et al., 1987) se fixent sur la partie N-terminale du vWF ce qui correspond aux domaine D'D3 (fig 5). Ceci a été confirmé par des travaux de Jorieux et al., (1987). Takahashi et al., (1987) montrent que le site principal du vWF permettant la fixation du FVIII se situe sur les 272 premiers acides aminés du vWF correspondant à un fragment de 35 kDa.

VI - INTERACTION DU vWF AVEC LES PLAQUETTES

La ristocétine induit l'agglutination de plaquettes d'un plasma riche en plaquettes de sujet normal. Par contre, cette agglutination n'est pas observée chez un malade atteint de maladie de Willebrand sévère (Howard et Firkin, 1971) ni atteint de la thrombopathie de Bernard-Soulier (Howard et al. 1973 b, Ruggeri et al., 1983). Cette agglutination est dépendante du taux de facteur Willebrand plasmatique puisque ce facteur se fixe aux plaquettes en présence de ristocétine (Zucker et al., 1977).

Deux hypothèses tendent à expliquer l'action de la ristocétine :

- le vWF et les plaquettes sont chargés négativement et donc se repoussent mutuellement. En présence de ristocétine chargée positivement, cet effet de charge s'annule, ce qui permet l'interaction du vWF avec les plaquettes (Coller et Gralnick, 1977).
- la deuxième hypothèse repose sur la fixation de la ristocétine sur un récepteur plaquettaire (GpIb) d'une part, et sur le vWF d'autre part (Kao et al. 1979, Morisato et Gralnick, 1980).

La fixation du vWF aux plaquettes en présence de ristocétine est indépendante des ions divalents (Kao et al., 1979) et du métabolisme plaquettaire. Elle peut donc se faire avec des plaquettes fixées au formaldéhyde ou au glutaraldéhyde (Allain et al., 1975).

On constate que les multimères de haut poids moléculaire (HPM) du vWF se fixent préférentiellement aux plaquettes en présence de ristocétine (Doucet de Bruine et al., 1978) et induisent une agglutination plaquettaire en présence de ristocétine fortement supérieure à celle obtenue avec des multimères de plus faible poids moléculaire. Ces observations sont confirmées par l'étude de certains variants de la maladie de Willebrand, qui se caractérisent par un temps de saignement fort augmenté, un taux d'antigène du vWF (vWF:Ag) légèrement diminué et une agglutination des plaquettes en présence de ristocétine presque nulle. En effet, l'analyse des multimères du vWF de ces malades révèle l'absence des multimères de HPM. L'agrégation des plaquettes en présence de ristocétine peut donc, dans certains cas, être directement corrélée avec le temps de saignement.

* L'existence d'un récepteur plaquettaire spécifique du vWF est

mis en évidence par l'étude de plaquettes de malades atteints du syndrome de Bernard-Soulier qui est une thrombopathie de transmission autosomale récessive. Les plaquettes de ces malades n'agrègent pas en présence de ristocétine et de vWF mais se comportent normalement en présence de thrombine (Ruggeri et al., 1983, Howard et al., 1973 a) puisqu'elles ont un déficit en glycoprotéine membranaire appelé GpIb (Clemetson et al., 1982) qui est le récepteur du vWF sur la plaquette en présence de ristocétine. Chez certains de ces malades traités avec des concentrés plaquettaires, il apparaît des anticorps anti-plaquettaires qui inhibent l'agglutination des plaquettes normales en présence de ristocétine (Tobelem et al., 1976). Cette inhibition est également obtenue en présence d'anticorps monoclonaux dirigés contre la GpIb.

D'autres études se sont portées sur les structures du vWF et de la GpIb nécessaires à cette interaction en présence de ristocétine. Ainsi des travaux ont pu montrer qu'en présence de ristocétine, la GpIb fixait le dimère de 440 000 daltons ainsi que le fragment de 285 000 daltons obtenu après hydrolyse enzymatique par la StV8 (Bockenstedt et al., 1986).

D'autre part, un fragment protéolytique de la GpIb, la glycolalicine se fixe encore sur le vWF en présence de ristocétine. Par contre, si on libère les acides sialiques terminaux, le galactose et la Nacétylglucosamine de la glycolalicine, la fixation est diminuée d'environ 50 % (Michelson et al. 1986).

L'étude d'une autre maladie hémorragique autosomale récessive, la thrombasthénie de Glanzmann a permis de mettre en évidence un autre récepteur du vWF. Chez ces malades on observe une agrégation plaquettaire perturbée en présence d'inducteur de l'agrégation comme la thrombine, l'ADP, le collagène, l'épinéphrine mais pas la ristocétine (Tobelem et al., 1976). On constate également que leurs plaquettes ne fixent pas le vWF en présence de thrombine (Ruggeri et al., 1982). Cette anomalie est liée à l'absence ou à l'incapacité de se complexer des glycoprotéines IIb et IIIa.

La maladie appelée pseudo-vWD ou "platelet-type vWD" correspond à une anomalie plaquettaire intrinsèque héréditaire qui se traduit par une agrégation des plaquettes induite par le vWF natif en absence de ristocétine et une adsorption des multimères de masse moléculaire élevée du vWF. En conséquence, dans le plasma de ces malades on note une absence des HPM du vWF associée à une augmentation de l'agglutination des plaquettes en présence de faibles quantités de ristocétine (RIPA).

Récemment Peterson et al., (Peterson et al., 1987) ont montré que l'agrégation des plaquettes d'un PRP normal était possible en absence d'inducteur de l'agrégation en augmentant simplement la force de cisaillement (180 dyne/cm^2). Cette agrégation est, elle aussi, dépendante du vWF et des glycoprotéines de membrane plaquettaire GpIb et GpIIb et IIIa.

VII - FIXATION DU vWF AU COLLAGÈNE

De nombreux travaux ont démontré que les collagènes fixaient le vWF (Santoro et al., 1983, Scott et al., 1981). Cette propriété s'applique aussi bien aux collagènes interstitiels de type I et III (Legrand et al., 1978, Nyman, 1980) (le type III étant le plus réactif), qu'aux collagènes de la membrane basale de type IV et V (Santoro, 1981).

La nature de cette interaction n'est pas encore bien connue ; cependant, récemment, Bockenstedt et al. (1986) ont montré que le vWF formait en présence de facteur XIII activé, une liaison covalente avec le collagène. Comme nous l'avons vu p. 9, la fibre de collagène est composée de l'association de monomères hautement ordonnés, mais il semble que seul l'association de quelques monomères soit suffisante pour permettre la fixation du vWF au collagène (Morton et al., 1983). Par contre, l'action d'agents dénaturants sur le collagène, lui fait perdre ses propriétés de fixation au vWF.

L'existence de deux sites de fixation du collagène sur le vWF a été démontrée. L'un est localisé sur le domaine A1 du vWF entre les résidus 567-621 (Houdijk et al., 1986b) alors que l'autre a été montré plus récemment sur le domaine A3 (Roth et al., 1986) entre les résidus 969-992. Ces deux domaines montrent des homologies de séquence.

La structure même du vWF intervient également dans sa fixation au collagène puisque certains auteurs ont montré que les multimères de HPM du vWF se fixaient préférentiellement au collagène (Santoro 1983, Kessler et al. 1984, Brown et al., 1986). D'autre part, le dimère du vWF ainsi que les fragments protéolytiques obtenus après hydrolyse par la StV8, n'entrent pas en compétition avec le vWF dans sa fixation au collagène, (Bockenstedt et al. 1986) ce qui confirme l'importance de la structure multimérique du vWF.

VIII - ROLE DU vWF DANS L'ADHESION PLAQUETTAIRE

A. ROLE DU vWF PLASMATIQUE

1) Adhésion des plaquettes au collagène

L'adhésion des plaquettes au collagène purifié obtenue en présence d'un plasma de Willebrand sévère, est normale pour des vitesses de cisaillement inférieures à 500 sec^{-1} (Houkijk et al., 1985a). Au dessus de cette valeur, contrairement aux valeurs obtenues avec un plasma normal, l'adhésion plaquettaire n'augmente pas proportionnellement au flux sanguin. Ainsi à $1\ 000 \text{ sec}^{-1}$, l'adhésion des plaquettes obtenue en présence d'un plasma sans vWF est environ 3 fois inférieure à celle obtenue avec un plasma normal. Le vWF plasmatique joue un rôle en se fixant sur le collagène puisque en préincubant les lamelles recouvertes de collagène avec du vWF purifié, la perfusion d'un sang dépourvu de vWF donne une adhésion plaquettaire normale (Houdijk et al., 1985 a).

2) Adhésion des plaquettes au sous-endothélium

L'adhésion des plaquettes au sous-endothélium est dépendante du taux de vWF plasmatique pour des vitesses de cisaillement supérieures à 600 sec^{-1} (Sakariassen et al., 1980). Chez le vWD sévère l'adhésion des plaquettes est fortement diminuée à haute force de cisaillement (Tschopp et al., 1974, Weiss et al., 1978 a).

Dans le système de perfusion selon Baumgartner, où l'artère est une artère de lapin normal, on constate que l'adhésion plaquettaire résultante de la perfusion avec un sang de Willebrand sévère n'est que faiblement diminuée puisque le sous-endothélium contient du vWF.

L'étude de l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium en présence de vWF radiomarqué à l'iode 125, a permis de montrer que le vWF se fixe au sous-endothélium essentiellement pendant les deux premières minutes de perfusion. Pendant la première minute, le nombre de plaquettes fixées au sous-endothélium est similaire quelque soit le taux de vWF plasmatique. Cependant, l'augmentation de l'adhésion plaquettaire après 2 à 5 minutes ne se produit qu'en présence de vWF. On peut alors dire que la fixation du vWF au sous-endothélium précède l'augmentation de l'adhésion plaquettaire (Bolhuis et al., 1981).

En perfusant du sang de vWD, on observe une augmentation des plaquettes "contact" et une nette diminution des plaquettes étalées et des thrombi (Bolhuis et al., 1981). Cependant cette augmentation des plaquettes contact est relative puisque chez le sujet normal, les plaquettes contact s'activent et s'étalent avant de former des agrégats.

D'autres travaux ont accordé au vWF un rôle essentiel dans la phase initiale d'attachement (Turitto et al., 1983). Ces travaux ne sont pas nécessairement contradictoires. En effet, il est possible que le vWF soit impliqué dans la phase initiale d'attachement en créant un lien solide entre la plaquette et le sous-endothélium, ce qui permettrait à la plaquette de pouvoir ultérieurement s'étaler. En absence de vWF, la plaquette contact risque au bout d'un certain temps d'être détachée par le flux sanguin.

De l'ensemble de ces travaux, on peut conclure que le vWF plasmatique est nécessaire à l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium surtout à haute vitesse de cisaillement.

B. ROLE DU vWF DU SOUS-ENDOTHELIUM

Le vWF du sous-endothélium a été mis en évidence par une technique d'immunofluorescence. Stel et al. (1985) ont montré que l'adhésion plaquettaire était fortement diminuée à des vitesses de cisaillement supérieures à 500 sec^{-1} lorsque le sous-endothélium était préalablement incubé avec un anticorps monoclonal dirigé contre le vWF ayant un effet inhibiteur sur la fixation du vWF aux plaquettes en présence de ristocétine ainsi que sur l'agrégation plaquettaire induite par la ristocétine. Ces auteurs ont donc montré que l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium à haute vitesse de cisaillement était dépendante à la fois du vWF plasmatique et sous-endothélial.

C. IMPORTANCE DE LA STRUCTURE MULTIMERIQUE DU vWF DANS L'ADHESION PLAQUETTAIRE

La structure multimérique du vWF influence son rôle dans l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium, ainsi que dans la correction du temps de saignement chez les vWD. Il a été montré que les concentrés thérapeutiques riches en FVIII/vWF mais dont les formes multimériques du vWF de HPM sont absentes, ne corrigent pas le temps de saignement chez les vWD (Blatt et al., 1976, Green et Potter, 1976). Aussi, dans le système de chambre

de perfusion, ces concentrés ne corrigent pas l'adhésion plaquettaire bien que les taux de cofacteur de la ristocétine soit élevé. On observe également chez les variants de la maladie de Willebrand qui ont une absence des HPM du vWF, une augmentation du temps de saignement et une adhésion plaquettaire diminuée dans le système de perfusion. A partir de ces observations, il semble bien que les multimères de masse moléculaire élevée du vWF aient un rôle important dans l'adhésion plaquettaire. De plus, ces multimères sont plus facilement adsorbés sur les plaquettes en présence de ristocétine ou de collagène (Doucet de Bruine et al., 1978, Santoro, 1983). Par contre, Aihara et al. (1986) ont montré que les multimères de faible masse moléculaire du vWF sont impliqués dans l'interaction initiale entre les plaquettes et les billes de verre recouvertes de collagène, mais ce système d'étude est cependant éloigné des systèmes de perfusions. Néanmoins, l'importance de la structure multimérique dans l'adhésion plaquettaire est controversée. En effet, lorsque l'on sépare en trois le volume mort d'une colonne de gel filtration après injection de vWF, les trois fractions qui contiennent des multimères de masse moléculaire différente (6 à 14, 4 à 9, 3 à 7.5×10^6 kDa) corrigent de la même façon l'adhésion plaquettaire (Sixma et al., 1984 a). De plus les mêmes auteurs montrent qu'en présence de 3 mM de dithioerythritol (DTE), les multimères du vWF, bien qu'ayant une masse de 0.5 à 1.5×10^6 kDa et un cofacteur de la ristocétine fortement diminué, corrigent toujours l'adhésion plaquettaire. Il faut néanmoins souligner qu'à 5 mM de DTE les multimères du vWF ont toujours une masse moléculaire de 0.5 à 1.5×10^6 kDa, mais ne corrigent plus l'adhésion plaquettaire. De plus, le fragment SpIII du vWF obtenu après hydrolyse par la StV8, corrige l'adhésion plaquettaire au collagène d'une façon équivalente au vWF natif, montrant que la structure multimérique n'est pas nécessaire à l'adhésion plaquettaire (Sakariassen et al., 1986 a). Malgré tout, dans cette expérience, le fragment SpIII est incubé avec le collagène et non pas introduit dans le perfusat. On peut donc se demander si la fixation du SpIII au collagène, dans ces conditions et non en flux continu, ne permettrait pas une pseudo-multimérisation du vWF capable d'induire une adhésion plaquettaire normale.

IX - ROLE BIOLOGIQUE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE DU vWF

A. ETUDE DE CAS PATHOLOGIQUES

Des travaux semblent montrer qu'il pourrait y avoir une anomalie de la composition en monosaccharides du vWD chez certains malades vWD.

Ainsi, Gralnick a montré un défaut de coloration de Schiff à l'acide periodique, du vWF isolé à partir de 5 sujets atteints de la maladie de Willebrand (Gralnick et al., 1976). Par contre, une étude similaire faite par Zimmerman chez 15 malades (Zimmerman et al., 1979) réfute cette hypothèse. Cependant, les faibles taux de vWF chez les malades atteints de vWD font que cette méthode semble peu adaptée à la détection d'une éventuelle anomalie du taux de sucres du vWF dans la vWD.

L'utilisation de lectines marquées à l'iode 125 (ConA spécifique du Mannose et du Glucose) montre que le vWF d'un malade vWD a une affinité diminuée pour la 125 I ConA, ce qui pourrait correspondre à une anomalie des glycanes (Howard et al., 1979). De même, une technique de radio-immunoélectrophorèse montre que le vWF de certains malades vWD se fixe moins bien sur la ConA que le vWF normal (Howard et al., 1981). Pour Mikani et al., (1983), il y a une étroite correspondance entre la diminution de l'affinité de la lectine RCA I (spécifique du galactose) pour le vWF de malade de vWD de type IIA et, celle de multimères de vWF normal de faible masse moléculaire. De plus, le taux de galactose des multimères de faible poids moléculaire serait moins important que celui des autres multimères.

Une étude de Gralnick et al., (1976) semble montrer que les taux d'acide sialique, de galactose et de N-acétylglucosamine libérés par action d'exoglycosidases sur le vWF d'un malade vWD seraient inférieurs à ceux obtenus à partir de vWF de sujets normaux. Cependant, il faut considérer ces résultats avec beaucoup de prudence vu les très faibles quantités de vWF utilisées. De Marco et al., (1985b) ont également montré que le vWF d'un Willebrand type IIB induisait de la même façon que le vWF désialylé, une agrégation du PRP, suggérant que le vWF de ces malades pourrait être désialylé. Cependant, des travaux récents du même auteur (De Marco et al., 1987) effectués sur 4 malades vWD de type IIB issus de 3 familles différentes et chez 4 sujets normaux, tendent à montrer que le taux d'acide sialique n'est pas significativement différent entre les malades et les sujets normaux.

B. UTILISATION DE GLYCOSIDASES

L'étude du rôle de la copule glycanique du vWF peut se faire en utilisant des glycosidases. On compare alors les propriétés du vWF modifié par ces enzymes avec celles du vWF natif.

1) Utilisation des neuraminidases

L'acide sialique représente 30 % des sucres du vWF. Les deux principales neuraminidases utilisées dans la littérature sont celles de *Clostridium perfringens* et *Vibrio cholerae* généralement utilisées à pH acide. Elles libèrent la presque totalité de l'AS du vWF permettant d'obtenir l'asialo vWF ou (Neu)ase vWF, (Federici et al., 1984).

a) Propriétés du (Neu)ase vWF

Le (Neu)ase vWF a la propriété particulière d'induire l'agrégation des plaquettes d'un PRP en absence de tout inducteur de l'agrégation (Vermylen et al., 1973, Vermylen et al., 1974, Vermylen et al., 1976, Kirby et Mills, 1975, Gralnick et al., 1985, De Marco et Shapiro, 1981, De Marco et al., 1985 a). Cependant, cette propriété n'est possible qu'en PRP citraté, et est inhibée par l'EDTA (Vermylen et al., 1974, Kirby et Mills, 1975, De Marco et Shapiro, 1981). Elle est également diminuée lorsque l'on utilise des plaquettes lavées ou formolées, ou un PRP provenant d'un malade ayant une thrombopathie de Bernard-Soulier (De Marco et Shapiro, 1981). Le site de fixation du Neu(ase) vWF sur la plaquette semble être la glycoprotéine GpIb et le complexe GpIIb/IIIa puisque sa fixation est fortement diminuée en présence d'un anticorps dirigé contre la GpIb et diminuée d'environ 1/3 en présence d'un anticorps anti-GpIIb IIIa (Gralnick et al., 1985, De Marco et al., 1985 a).

L'affinité du (Neu)ase vWF pour la plaquette a été attribuée à la perte de ses charges négatives. Sa fixation sur la GpIb entrainerait l'expression des sites récepteurs du complexe GpIIb/IIIa sur lesquels se fixerait le (Neu)ase vWF et le fibrinogène, induisant ainsi l'agrégation plaquettaire.

En outre, le (Neu)ase vWF se fixe au collagène type I d'une façon similaire au vWF natif (Kessler et al., 1983).

Pour certains auteurs, l'agrégation des plaquettes induite par la ristocétine en présence de vWF n'est pas modifiée après désialylation du vWF (Federici et al., 1984, De Marco et al., 1985a, Gralnick et al., 1982) alors que pour d'autres elle serait diminuée de 50 à 74 %. Cependant, il est toujours difficile d'apprécier ce type d'agrégation puisque le (Neu)ase vWF induit à lui seul l'agrégation des plaquettes d'un PRP et peut donc modifier l'agrégation en présence de ristocétine. Aussi, cette diminution est souvent

associée à une modification de la distribution des formes multimériques du vWF (Federici et al., 1984, Goudemand et al., 1985).

Toujours en présence de ristocétine, le (Neu)ase vWF se fixe aux plaquettes d'une façon similaire au vWF natif (Goudemand et al., 1985).

La durée de vie du (Neu)ase vWF est très inférieure à celle du vWF natif (Sodetz et al., 1977) puisque le (Neu)ase vWF comme d'autres glycoprotéines désialylées, se fixe sur un récepteur hépatique spécifique des résidus de galactose (Hudgin et al., 1974).

2) Action d'une β -galactosidase sur le vWF

L'utilisation d'une β -galactosidase sur le vWF natif permet de retirer 19 (Gralnick et al., 1983) à 20 % (Goudemand et al., 1985) des résidus de galactose. En présence de ristocétine, le vWF partiellement dégalactosylé permet l'agrégation des plaquettes lavées ou formolées.

Au laboratoire, nous avons montré que la fixation du vWF, modifié par une β -galactosidase, aux plaquettes en présence de ristocétine est fortement diminuée, alors qu'elle ne l'est pas en présence de thrombine (Goudemand et al., 1985) et que la composition multimérique du vWF dégalactosylé partiellement montre une perte des formes multimériques de masse moléculaire élevée (Goudemand et al., 1985). Cependant pour Gralnick et al. (1983) cette composition n'est pas modifiée.

3) Action d'une β -galactosidase sur le (Neu)ase vWF

L'action d'une β -galactosidase sur le (Neu)ase vWF libère un taux de galactose de 48 à 60 % pour certains auteurs (Goudemand et al., 1985) ou de 83 % pour d'autres auteurs (Gralnick et al., 1983). Cette différence pouvant s'expliquer par des conditions d'hydrolyse différentes.

Mise à part les travaux de Federici et al., (1984) la plupart des articles se rapportant aux propriétés du (Neu)ase vWF modifié par une β -galactosidase sont concordants : l'agrégation des plaquettes en présence de ristocétine étant diminuée de 75 à 90 % en fonction du taux de galactose libéré (Gralnick. 1978, Gralnick et al., 1983, Kao et al., 1980, Morisato et Gralnick 1980). Pour Federici, cette agrégation est diminuée de 40 % si l'on n'utilise pas d'inhibiteur de protéases, alors qu'en présence d'inhibiteur de protéases

(benzamidine, leupeptine, aprotinine), il n'y a pas de diminution (Federici et al., 1984).

En présence de ristocétine, la fixation aux plaquettes du (Neu)ase vWF traité par une β -galactosidase est fortement diminuée (Morisato et Gralnick 1980, Goudemand et al., 1985) alors qu'en présence de thrombine elle n'est pas modifiée (Goudemand et al., 1985).

Pour la plupart des auteurs, l'étude électrophorétique du (Neu)ase vWF modifié par une β -galactosidase, montre une perte des HPM du vWF (Gralnick et al., 1983, Goudemand et al., 1985). Par contre, Federici et al. (1984) en présence d'inhibiteur de protéases n'observent pas de disparition des HPM du vWF mais simplement l'apparition de formes multimériques de migration plus rapide qu'ils attribuent à une diminution de la masse moléculaire consécutive à la perte de l'acide sialique et du galactose.

4) Utilisation de la galactose oxydase

L'oxydation des résidus de galactose du (Neu)ase vWF, lui fait perdre ses propriétés d'agrégation du PRP (Vermylen et al., 1973). De même, l'oxydation du galactose du vWF natif et du (Neu)ase vWF (Fukui et al., 1977) induit une forte diminution de l'agrégation des plaquettes formolées en présence de ristocétine. La réduction des résidus galactose oxydés restaure l'agrégation (Gralnick, 1978).

La composition multimérique du (Neu)ase vWF est également modifiée après action de la galactose oxydase, avec une perte des multimères de masse moléculaire élevée (Gralnick et al., 1983).

5) Utilisation d'endoglycosidases

Les N-glycannes tels que le N-glycane majeur du vWF, peuvent être libérés totalement en utilisant respectivement une endoglycosidase qui coupe la liaison β -1-4 réunissant les deux résidus N-acétylglucosamines se situant près du point d'attache de la chaîne glycanique, puis une glycopeptidase qui hydrolyse la liaison asparaginy-N-acétylglucosamine.

L'hydrolyse du vWF par l'endo- N-acétylglucosaminidase F (endo-F) extraite de *Flavobacterium meningosepticum* (Elder et Alexander, 1982) a permis de réduire à 31 % la copule glycanique du vWF (Federici et al., 1984). Ainsi,

Federici et al. (1984) montrent que l'activité cofacteur de la ristocétine n'est que très peu diminuée (89 % d'activité restante) et concluent que la copule glycanique du vWF n'est pas impliquée dans l'agrégation des plaquettes en présence de ristocétine. De même, la composition multimérique reste normale, avec cependant apparition de formes de migration plus rapides.

6) Action de lectines sur le vWF

La concanavoline A (conA) se fixe d'une façon semblable sur les différents multimères du vWF (Furlan et al., 1980).

La lectine de *Ricinus communis* (RCA) qui reconnaît spécifiquement le galactose, se fixe mieux sur les chaînes peptidiques obtenues après réduction de polymères de masse moléculaire élevée que sur celles provenant des polymères de bas poids moléculaire. Martin et al., (1983) montrent que les fragments obtenus après hydrolyse trypsique du vWF (200 000, 116 000, 45 000 daltons) réagissent tous les trois de la même façon vis-à-vis de la lectine RCAII, avant ou après traitement par la neuraminidase, ceci tendant à prouver que le contenu en galactose de ces trois fragments est identique.

7) Autres expériences

Hellerquist et al. (1985) montrent que le vWF bovin perd ses propriétés agglutinantes vis-à-vis des plaquettes formolées d'origine humaine après action d'une β -galactosidase d'*Escherichia coli*.

Wagner et al. (1986) utilisent un inhibiteur de la N-glycosylation, la tunicamycine, et montrent que le vWF alors synthétisé est monomérique et ne peut se dimériser. La glycosylation du vWF paraît donc importante dans les processus de polymérisation.

Des résultats récents (Federici et al., 1987) montrent que l'action d'enzymes protéolytiques comme la plasmine, la chymotrypsine et la trypsine, induit une diminution des HPM du vWF nettement plus marquée lorsque le vWF est désialylé et partiellement dégalactosylé. Ces travaux tendent à confirmer le rôle protecteur des glycanes.

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL ET METHODES

I - LE SYSTEME DE PERFUSION

A. RAPPELS

Comme nous l'avons vu page 6, le système de perfusion est composé d'un réservoir qui contient le sang, d'une pompe, d'un entonnoir et de la chambre de perfusion (Fig. 3 p. 7). Il existe deux types de chambre de perfusion : la chambre rectangulaire dans laquelle est insérée une artère ombilicale humaine, et la chambre annulaire dans laquelle sont insérées des lamelles recouvertes de collagène. Après avoir présenté les facteurs physiques influençant ces deux systèmes, nous les décrirons en détail puis présenterons les caractéristiques du perfusé, de la perfusion avant de présenter l'interprétation et les écueils de cette technique.

B. FACTEURS PHYSIQUES INFLUENCANT L'ADHESION PLAQUETTAIRE

L'étude de l'adhésion plaquettaire avec le système de perfusion se fait sous le contrôle de différents paramètres physiques comme la durée de l'expérimentation, l'intervention des éléments cellulaires du sang et la vitesse de flux.

1) Influence du temps de perfusion

L'adhésion plaquettaire augmente en fonction du temps de perfusion (Sakariassen et al., 1980). Cette augmentation varie suivant la nature du constituant thrombogène utilisé.

Sur collagène type I ou sur sous-endothélium de lapin, on observe une augmentation de l'adhésion plaquettaire dans les 5 premières minutes de perfusion, avant apparition d'un plateau. Par contre, en présence de collagène type III, l'adhésion plaquettaire augmente régulièrement jusqu'à des temps supérieurs à 10 minutes. Cette augmentation est essentiellement due à l'apparition de thrombus plaquettaire et c'est pour cette raison que les temps de perfusions utilisés pour l'étude de l'adhésion plaquettaire sont limités en général de 3 à 5 minutes.

2) Influence des constituants cellulaires du sang

L'adhésion plaquettaire augmente avec le nombre des plaquettes sanguines lorsque leur concentration varie de 25 à 300 10^9 par litre de plasma (Sakariassen et al., 1980).

L'adhésion des plaquettes dépend également de l'hématocrite (Turitto et Baumgartner, 1975 ; Turitto et Weiss, 1980). Cette dépendance a tout d'abord été expliquée par la libération d'ADP provenant des globules rouges endommagés (Born et Wehmeyer, 1979). Cependant, la substitution des globules rouges par des membranes de globules rouges (dépourvus d'ADP) n'induit pas de modification de l'adhésion plaquettaire (Sakariassen et al., 1983). D'autre part, AartT et al (1983) ont montré que l'adhésion plaquettaire était dépendante de la taille des globules ainsi que de leur déformabilité (Aart et al., 1984b). Tous ces travaux montrent que les globules rouges ont un rôle hémodynamique dans l'adhésion plaquettaire.

3) Influence de la vitesse du flux

La vitesse de flux est directement proportionnelle à la vitesse de cisaillement qui est un paramètre essentiel de l'adhésion plaquettaire. Pour définir la force de cisaillement, il faut considérer deux couches fluides en mouvement, séparées par une distance infinitésimale dx . La force exercée entre ces deux fluides se définit comme la force de cisaillement (τ) usuellement exprimée en mPa. Le gradient de vitesse entre ces deux couches (dV/dx) se définit comme la vitesse de cisaillement (γ), exprimée en sec^{-1} . γ est donc proportionnel à la vitesse du flux et inversement proportionnel à la distance dx . Ainsi, au niveau des petites artères, la vitesse de cisaillement sera souvent beaucoup plus élevée que dans les veines et les grosses artères. Les vitesses de cisaillement au niveau des veines et grosses artères sont de 10 sec^{-1} à 100 sec^{-1} , au niveau des petites artères de 100 sec^{-1} à 1 000 sec^{-1} , et dans la microcirculation de 1 000 sec^{-1} à 10 000 sec^{-1} .

Le calcul théorique de la vitesse de cisaillement dans la chambre de perfusion s'applique facilement à des liquides dit Newtonien, c'est-à-dire que la viscosité ($\mu = \tau/\gamma$) du fluide ne varie pas avec la force exercée sur celui-ci.

Cette propriété ne s'applique qu'aux fluides composés de petites molécules et ne peut pas s'appliquer directement au sang. En effet, 40 % du

volume sanguin est composé de grandes cellules, les globules rouges, qui influencent les propriétés hémodynamiques du sang. La viscosité du sang est ainsi dépendante de la déformation ou de l'agrégation des globules rouges soumis à des forces. Le sang ne sera donc considéré comme un liquide Newtonien que sous certaines conditions :

A l'état statique ou à de très basses vitesses de cisaillement, les hématies sont principalement sous forme d'agrégat ce qui donne une viscosité apparemment élevée.

Quand on augmente la vitesse de cisaillement, les globules rouges se dispersent, et la viscosité diminue puisque les globules rouges ont la propriété de se déformer .

Quand la vitesse de cisaillement atteint 100 sec^{-1} , la viscosité du sang reste constante et dans ces conditions, le sang peut être considéré comme un liquide Newtonien (Merril, 1969). Il faut également ajouter que, dans le système de perfusion en chambre annulaire, ces conditions seront respectées si l'artère utilisée est d'une épaisseur fine et uniforme sur tout le segment inséré dans la chambre (Aart et al., 1984a).

C. DESCRIPTION DU SYSTEME

La pompe péristaltique est une pompe VERDER VRX 200 munie d'un tuyau de pompe silicone de 1.6 mm d'épaisseur et de 3.2 mm de diamètre intérieur. L'entonnoir est en matière plastique. Sa partie d'écoulement inférieure doit avoir un diamètre de 3.5 mm. Le réservoir du perfusé est un tube plastique de 30 ml, sa forme conique diminue les risques d'introduire des bulles d'air dans le système. Du tuyau silicone de 1 mm d'épaisseur et de 3.2 mm de diamètre intérieur réunit les différentes pièces de système. L'ensemble est maintenu à 38°C au bain marie.

1) La chambre de perfusion annulaire

a) Description - Calcul de la vitesse de cisaillement

La chambre de perfusion annulaire est schématisée sur la figure 9.

L'artère ombilicale retournée en doigt de gant est enfilée sur la tige centrale de la chambre, en contact avec le flux sanguin. La vitesse de cisaillement (γ) est inversement proportionnelle à la distance $a = R_o - R_i$ séparant le sous-endothélium de la paroi interne de la chambre et est donnée

tige centrale

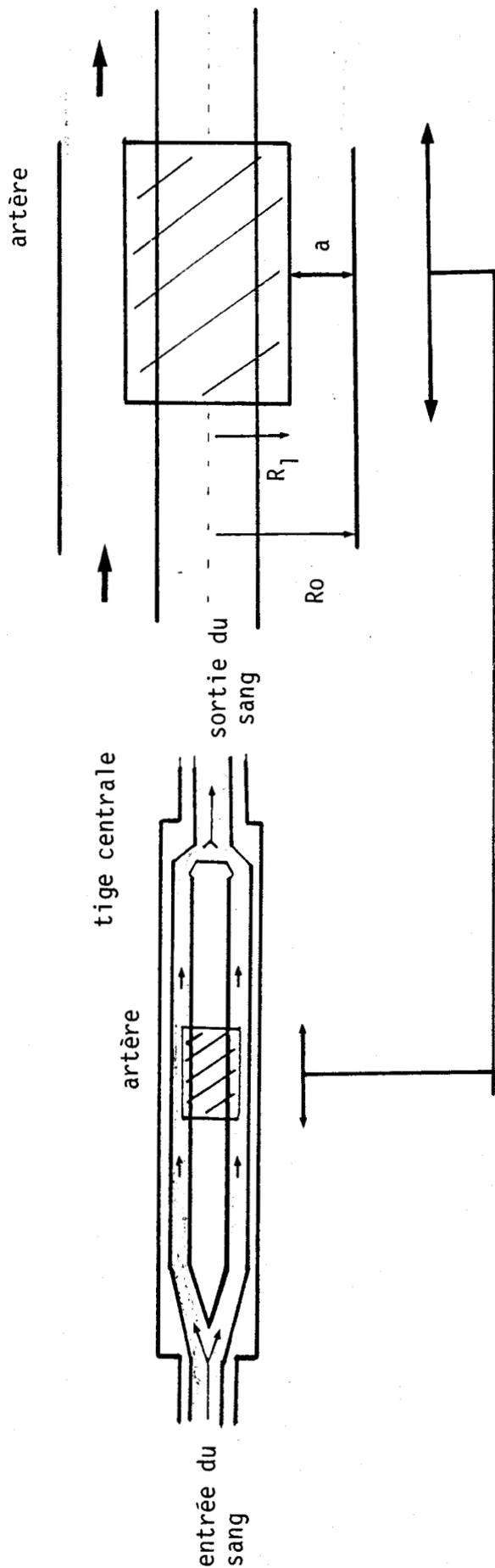


Figure 9 : SCHEMA DE LA CHAMBRE DE PERFUSION ANNULAIRE.

La distance $a = (R_o - R_1)$ est inversement proportionnelle à la vitesse de cisaillement.

par la formule générale :

$$\gamma = \frac{2Q}{\pi Ro^3} \frac{\frac{2K}{1-k^2} + \frac{1}{k \ln k}}{1+k^2 + \frac{1-k^2}{\ln k}}$$

dans notre chambre de perfusion : $Ro = 0.306 \text{ cm}$

et sachant que : $R1 = 0.185 \text{ cm}$ (0.17 rayon de la tige centrale + 0.015 épaisseur de l'artère)

et sachant que :

$$k = \frac{R1}{Ro} \text{ et } Q \text{ est le débit en ml/sec.}$$

$$\text{alors } = 291.6 \times Q$$

Ainsi pour un débit de pompe généralement utilisé de 2.8 ml/sec , la vitesse de cisaillement sera de 816 sec⁻¹ .

b) Préparation de l'artère ombilicale

Le cordon ombilical humain est prélevé juste après l'accouchement et conservé dans l'eau physiologique contenant des antibiotiques (200 U/ml pénicilline ; 0.2 mg/ml streptomycine). Le cordon ombilical comporte 2 artères et 1 veine. Les 2 artères sont extraites délicatement du cordon ombilical, puis sont lavées et conservées pendant au plus 72 heures dans l'eau physiologique contenant les antibiotiques. Avant leur utilisation dans le système de perfusion, les artères sont mises en tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM pH 7.4 contenant 200 U/ml de pénicilline et 0.1 mM d'aspirine. L'artère est ensuite enfilée sur une sonde métallique de 1.5 mm de diamètre et l'excès de tissu conjonctif est retiré de façon à ce que l'épaisseur de l'artère soit uniforme sur toute sa longueur, puis l'artère est retournée en doigt de gant. La simple exposition de l'endothélium à l'air ambiant pendant cette étape assure la déendothélialisation. Des segments d'artère de 1.5 cm de long sont

délicatement enfilés sur la tige centrale de la chambre de perfusion et conservés avant perfusion (1 à 2 heures maximum) dans un tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4.

2) La chambre de perfusion rectangulaire

a) Description - Calcul de la vitesse de cisaillement

La chambre de perfusion rectangulaire est schématisée sur la figure 10. Notre chambre comporte deux bouchons sur lesquels sont placées les lamelles recouvertes de collagène, ce qui nous permet de faire les mesures en duplicate. La vitesse de cisaillement (γ) est inversement proportionnelle à la profondeur de la gorge centrale et est donnée par la formule :

$$\gamma = \frac{1.03 \times 6 Q}{ab^2} \text{ sec}^{-1}$$

où : Q = débit en ml/sec

a = longueur de la gorge en cm

b = profondeur de la gorge en cm

Pour notre chambre de perfusion : a = 1 et b = 0.1 ce qui donne $\gamma = 618 \times Q$. Ainsi, pour un débit de pompe de 2.8 ml/sec, la vitesse de cisaillement sera de 1 730 sec^{-1} . Nous voyons que, pour un même débit, la vitesse de cisaillement obtenue avec ce type de chambre rectangulaire est environ 2 fois supérieure à celle de la chambre annulaire.

b) Préparation des lamelles recouvertes de collagène

* Préparation du collagène

Le collagène est isolé à partir d'artères ombilicales. Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur l'adhésion plaquettaire p. 9, les artères comportent des fibres de collagène essentiellement du type I et III.

Les collagènes de type I et III sont purifiés d'après la technique de Chandra-Rajan (1978) basée sur la renaturation des fibres de collagène après hydrolyse par la pepsine. En conséquence, nous travaillerons avec du collagène de type I et de type III. Pour notre travail, nous avons utilisé un mélange de

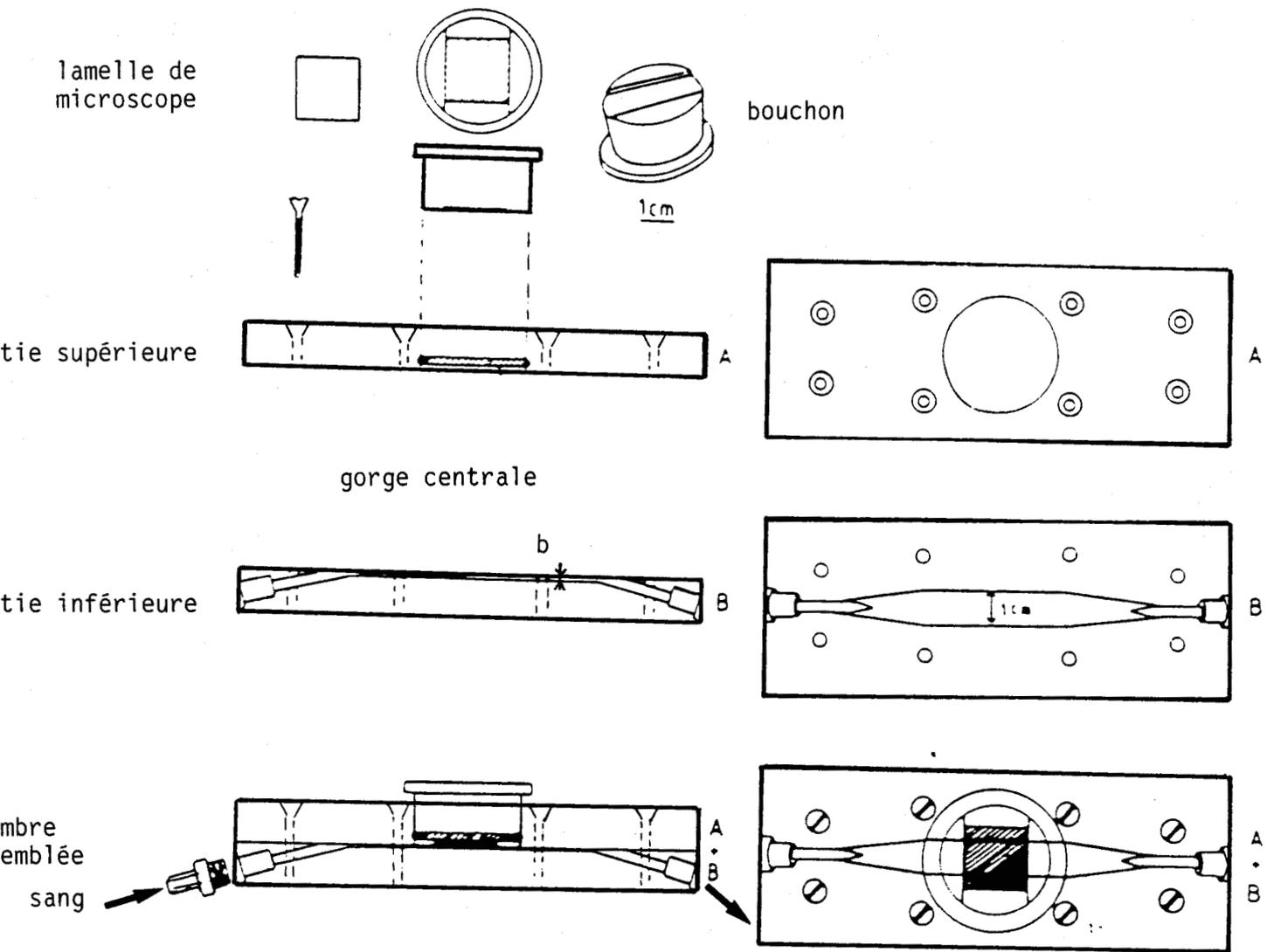


Figure 10 : SCHEMA DE LA CHAMBRE RECTANGULAIRE

Notre chambre comporte, elle, deux bouchons (la vitesse de cisaillement est inversement proportionnelle à la profondeur de la gorge centrale (b)).

collagène de type I et de type III qui induit une bonne adhésion plaquettaire. Le collagène non fibrillaire (collagène I, III nF) s'obtient par dialyse des fibres de collagène (1 mg/ml) contre une solution d'acide acétique 50 mM pendant 15 jours à + 4 °C. Le collagène obtenu est conservé à + 4 °C et garde ses capacités à induire l'adhésion plaquettaire pendant au moins 2 mois. La concentration de la solution de collagène est estimée en multipliant par 7.64 (Szymanowicz et al., 1982) le taux d'hydroxyproline trouvé dans la solution (Hypronosticon, Organon teknica). L'analyse en gel de polyacrylamide montre la présence de bandes à 115 et 129 kDa correspondant respectivement aux chaînes α_1 I et α_2 I, α_1 III.

* Préparation des lamelles

Les lamelles de microscope (18 x18 mm) sont lavées par trempage pendant une nuit dans de l'ethanol puis rincées à l'eau distillée.

Le collagène I, III nF est pulvérisé uniformément sur les lamelles avec un aérographe sous une pression d'azote de 1 atmosphère. La quantité finale de 30 μ g par cm^2 a été déterminée dans un premier temps par pesée, puis la méthode est standardisée sachant que 80 % de la quantité totale de départ est retrouvée sur les lamelles.

L'utilisation du collagène non fibrillaire permet de diminuer l'activation plaquettaire et donc de réduire la formation d'agrégats plaquettaires. Les lamelles sont conservées à température ambiante et utilisées dans les deux heures qui suivent la pulvérisation.

D. PREPARATION DES PERFUSATS

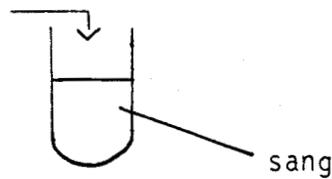
Quelle que soit le type de chambre de perfusion utilisé, les étapes de préparation des perfusats sont identiques.

Une poche de sang de 400 ml d'un donneur de sang n'ayant pas pris d'aspirine depuis au moins une semaine est prélevée sur 40 ml (1/10 en volume) de citrate trisodique à 3.1 %. Le sang est tout d'abord réparti en tubes coniques de 30 ml, centrifugé et traité selon le protocole de la figure 11 pour isoler le plasma, les plaquettes et les globules rouges.

Les plaquettes sont traitées par l'aspirine (p. 17) et ensuite radiomarquées par l'oxine d'Indium 111, puis, après élimination de l'Indium

400 ml de sang
3.1 % tri-Na citrate

9 Vol.]
1 Vol.]



centrifugation

200 g
10 min
temp. ambiante
sans frein

surnageant

culot

plasma riche en plaquettes PRP

1 volume PRP
+ 1 volume Krebs Ringer, pH 5
+ 10 μM aspirine

Agiter doucement
Attendre 5 à 10 min

centrifugation

550 g
10 min.
temp. ambiante

surnageant

culot
plaquettes
+ Krebs Ringer pH 6
+ αD glucose 0.9 g/l

marquage radioactif

Globules rouges

+ plasma pauvre en plaquettes PPP

centrifugation

2 000 g
10 min
temp. ambiante

culot

1 vol. globules rouges
1 vol. + H₂O physiologique
+ αD-glucose 0.9 g/l

PPP

2 000 g
5 min
temp. ambiante

culot

H₂O physiologique
+ globules blancs

1 vol. globules rouges
1 vol. + H₂O physiologique
+ αD glucose 0.9 g/l

2 000 g
5 min
temp. ambiante

culot

1 vol. globule rouge
1 vol. + H₂O physiologique
+ αD glucose 0.9 g/l

H₂O physiologique

2 000 g
20 min
Temp. ambiante

culot
Pool de globules rouges

H₂O physiologique
+ globules blancs

Figure 11 : Préparation du PPP, des globules rouges et des plaquettes sanguines

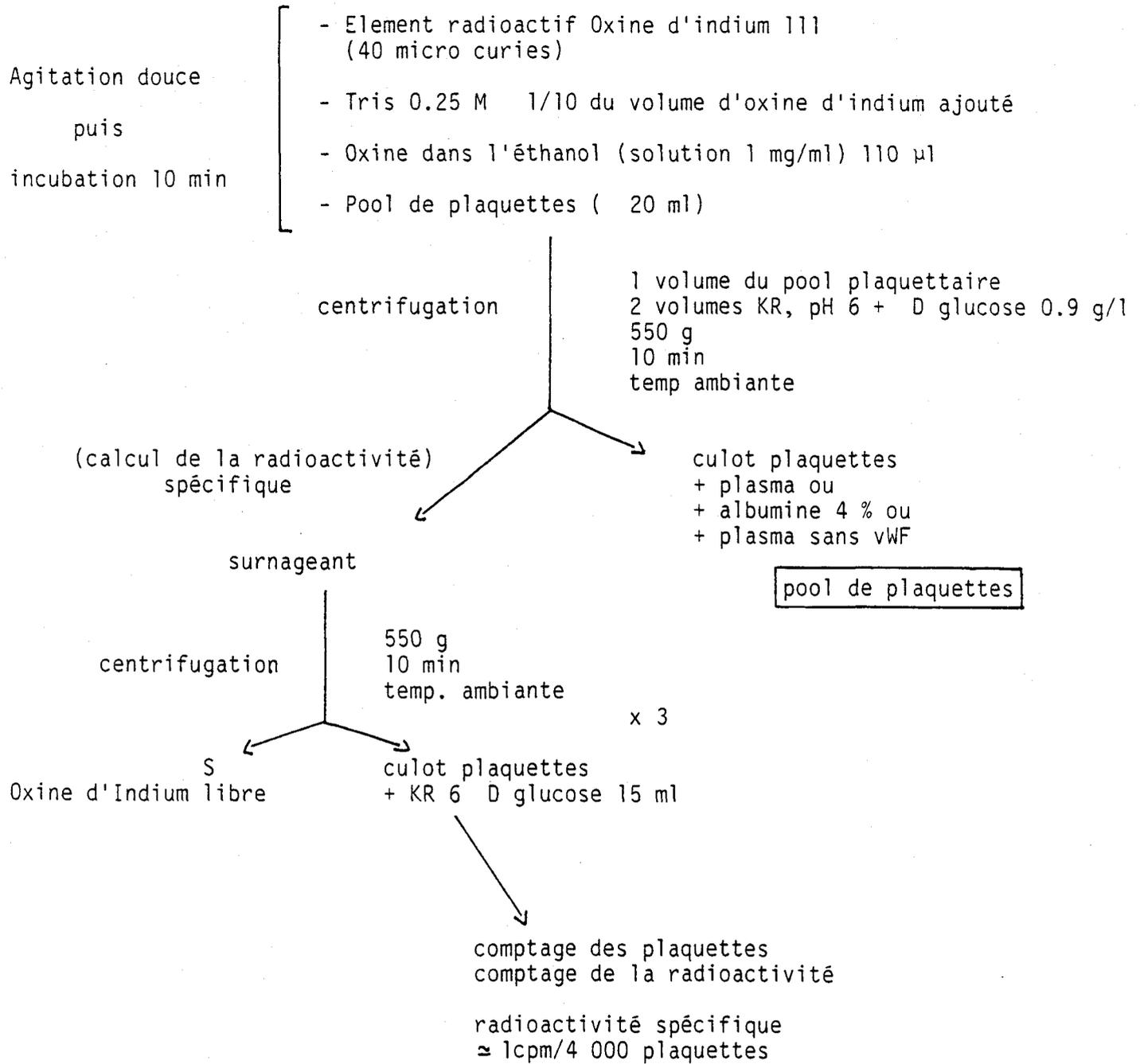


Figure 12 : Marquage radioactif des plaquettes

(KR : tampon de Krebs-Ringer)

libre, on compte la radioactivité associée aux plaquettes de façon à calculer la radioactivité spécifique (Fig. 12).

Le perfusat est composé de :

- 40 % de globules rouges (6 ml)
- 60 % de plasma (9 ml) (pool de 20 plasmas normaux, 11 mM tri Na citrate) ou d'une solution d'albumine à 4 %, contenant 320 000 plaquettes par microlitre.
- Volume total : 15 ml.

E. LA PERFUSION

1) Mode opératoire

Le principe de la perfusion est le même quelque soit le type de chambre utilisé. En effet, après avoir introduit l'artère ou les lamelles de collagène dans la chambre de perfusion, on rince le système avec 30 ml de tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4. Puis, le perfusat incubé 5 min à 38 °C est aspiré du récipient (bas) vers l'entonnoir (haut) par la pompe péristaltique ; le sang coule alors par gravité de l'entonnoir (haut) qui sert à réguler le flux vers la chambre de perfusion (bas) pour revenir ensuite dans le réservoir de départ. Le passage de sang à travers la chambre de perfusion se fait en général pendant 3 à 5 minutes en circuit fermé. A la fin de la perfusion, la chambre est de nouveau rincée par 30 ml de tampon HEPES. Enfin, l'artère ou la lamelle de microscope est retirée de la chambre de perfusion puis rincée avec le tampon HEPES.

2) Calcul du nombre de plaquettes fixées

Le nombre total de plaquettes radiomarquées fixées est évalué par comptage de la radioactivité.

a) Chambre annulaire

Les extrémités de l'artère sont coupées symétriquement de façon à ce que le segment central ait une longueur de 1 cm. Le segment de l'artère est alors placé dans un tube plastique puis le nombre des plaquettes fixées sur l'artère est calculé en comptant la radioactivité au compteur gamma.

Les résultats sont exprimées en 10^5 plaquettes par cm^2 ,

sachant qu'un segment d'artère de 1 cm de long a une surface de 1.16 cm².

$$\text{nombre de plaquettes/cm}^2 = \frac{\text{nombre de cpm} \times \text{radioactivité spécifique}}{1.16}$$

b) Chambre rectangulaire

Les lamelles de microscope sont cassées et placées dans des tubes dont on mesure ensuite la radioactivité au compteur gamma. La surface sur laquelle adhèrent les plaquettes est de 1.8 cm².

$$\text{nombre de plaquettes/cm}^2 = \frac{\text{nombre de cpm} \times \text{radioactivité spécifique}}{1.8}$$

3) Calcul du pourcentage d'adhésion

Le calcul du pourcentage d'adhésion a été effectué de 2 façons différentes :

- lorsqu'il s'agit d'une correction de l'adhésion plaquettaire avec du vWF, 100 % représente la valeur obtenue avec le plasma normal et 0 % la valeur obtenue avec le plasma de vWD (PvWD). Ainsi le pourcentage d'un échantillon X est calculé selon la formule :

$$\text{Pourcentage d'adhésion} = \frac{(\text{Adhésion échantillon X}) - (\text{Adhésion PvWD})}{(\text{Adhésion plasma normal}) - (\text{Adhésion PvWD})} \times 100$$

Par contre, lorsqu'il s'agit d'une inhibition de l'adhésion plaquettaire, le pourcentage de fixation est donné par simple rapport de la valeur d'adhésion de l'échantillon X sur la valeur d'adhésion du plasma normal :

$$\text{Pourcentage d'adhésion} = \frac{\text{Adhésion échantillon X}}{\text{Adhésion plasma normal}}$$

Ce mode de calcul dans ce cas est préférable puisque l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium n'est que peu diminuée avec un plasma de vWD, alors qu'elle l'est fortement en présence de certains anticorps

monoclonaux (p. 35).

4) Calcul du pourcentage de fixation du vWF radiomarqué au collagène ou au sous-endothélium dans le système de perfusion

Arbitrairement, nous avons fixé 100 % la valeur obtenue avec le vWF natif. Le pourcentage d'une préparation X est calculé en faisant le rapport de la valeur de la préparation X sur la valeur du vWF natif.

5) Calcul statistique

Nos résultats sont exprimés en moyennes ± 1 écart type. n représente le nombre de passages dans le système de perfusion pour une expérience. Lorsque n n'est pas précisé, il est égal à 3.

N représente le nombre d'expériences. Lorsque le nombre d'expérience n'est pas indiqué c'est qu'une seule expérience, soit n passages, a été effectuée.

Notre test de significativité s'appuie sur le test de Student pour une différence de moyenne. p représente le risque d'erreur à n-2 degré de liberté.

F. CAUSES D'ERREURS

1) Liées au système de perfusion

La lyse des globules rouges par la pompe à galets peut entraîner une libération d'ADP qui induit l'agrégation des plaquettes. Il est donc nécessaire de vérifier en fin de perfusion le taux d'hémoglobine libre qui ne doit pas excéder 300 $\mu\text{g/ml}$. Dans le cas contraire, il est nécessaire de régler l'étrier de la pompe de façon à augmenter la distance entre les galets et le tuyau dont l'épaisseur doit nécessairement être de 1.6 mm pour assurer une bonne rigidité.

La perte de chaleur due à ce qu'une partie du système (entonnoir, tuyau) se trouve à la température ambiante, doit être compensée par une température initiale légèrement supérieure à 37 °C (38 °C), et impose une longueur de tuyau calculée de façon à ne pas avoir d'excédents et des temps de perfusions relativement courts (environ 5 minutes).

La présence de bulles d'air dans le système de perfusion lors de

l'expérimentation induit une variation du nombre des plaquettes fixées.

Ces différentes causes d'erreurs liées au système de perfusion s'appliquent aussi bien au système en chambre annulaire, qu'en chambre rectangulaire, bien que les études morphométriques soient essentiellement adaptées au sous-endothélium.

2) Liées à la technique de la chambre annulaire

Les principales causes d'erreurs sont bien sûr liées à l'artère ombilicale elle-même. En effet, la dissection de l'artère ombilicale est une technique délicate qui doit aboutir à une artère uniforme, dépourvue de tissu conjonctif et sans lésion du sous-endothélium.

Aux extrémités de l'artère, le flux n'est plus laminaire, et l'adhésion plaquettaire dans cette région est augmentée. C'est pourquoi, il est important d'éliminer les deux extrémités (2.5 mm) pour avoir mesurer l'adhésion sur un segment uniforme.

Une autre cause d'erreur, réside dans l'imprécision de la mesure de la longueur du segment d'artère, avant comptage de la radioactivité, due à l'élasticité de l'artère.

3) Liées à la technique en chambre rectangulaire

Lorsque l'on travaille avec des plaquettes radiomarquées, la technique en chambre rectangulaire semble plus reproductible. En effet, dans ce système, la matrice de fixation des plaquettes (par exemple le collagène) est la même pour chaque expérimentation. Cependant, dans cette technique, la partie délicate de manipulation est la pulvérisation du collagène sur les lamelles, qui doit se faire uniformément.

D'autre part, nous avons remarqué que le flux de sang à l'intérieur de la chambre pouvait parfois déborder de la gorge centrale de la chambre de perfusion et de ce fait induire une erreur.

II - FIXATION DU vWF AUX FIBRES DE COLLAGENE ("BINDING" COLLAGENE)

A. COLLAGENE FIBRILLAIRE

La formation des fibres de collagène est assurée en dialysant le collagène non fibrillaire de type I, III (en solution à 1 mg/ml) contre un

tampon Na_2HPO_4 0.02 M pendant 48 h à + 4°C.

B. LA TECHNIQUE DU "BINDING COLLAGEN"

1) 50 microl. de chaque dilution de collagène (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16)

+ 250 microl. de plasma normal (Binding froid)

ou 99 % de plasma normal + 1 % vWF radiomarqué (Binding chaud)

vWF marqué = 7×10^7 cpm/mg

+ 10 microl. de liquide d'ascite

2) Incubation à 37 °C pendant 10 min.

3) Fin de réaction par centrifugation des fibres de collagène à 10 000 g pendant 5 min.

4) Calcul du pourcentage de vWF fixé

Binding froid : par dosage du vWF:Ag présent dans le surnageant, et sachant la quantité de vWF:Ag dans le plasma normal, on en déduit la quantité fixé aux fibres de collagène.

Binding chaud : après avoir vérifié par dosage du vWF:Ag en ELISA du vWF plasmatique que le vWF radiomarqué a la même affinité pour le collagène que le vWF plasmatique, on peut considérer que le pourcentage de radioactivité dans le culot de centrifugation correspond au pourcentage de vWF plasmatique fixé aux fibres de collagène.

III - AUTRES TECHNIQUES

A. Calcul du pourcentage des multimères de haut poids moléculaire (HPM) du vWF

L'enregistrement des profils multimériques est obtenu à partir des gels à 2.5 % d'agarose en présence de SDS, analysés au moyen d'un "HELENA P24 scanner". Le pourcentage de HPM du vWF est arbitrairement défini comme la proportion des pics correspondant aux multimers supérieurs ou égaux à la bande numérotée 5 (Fig.13).

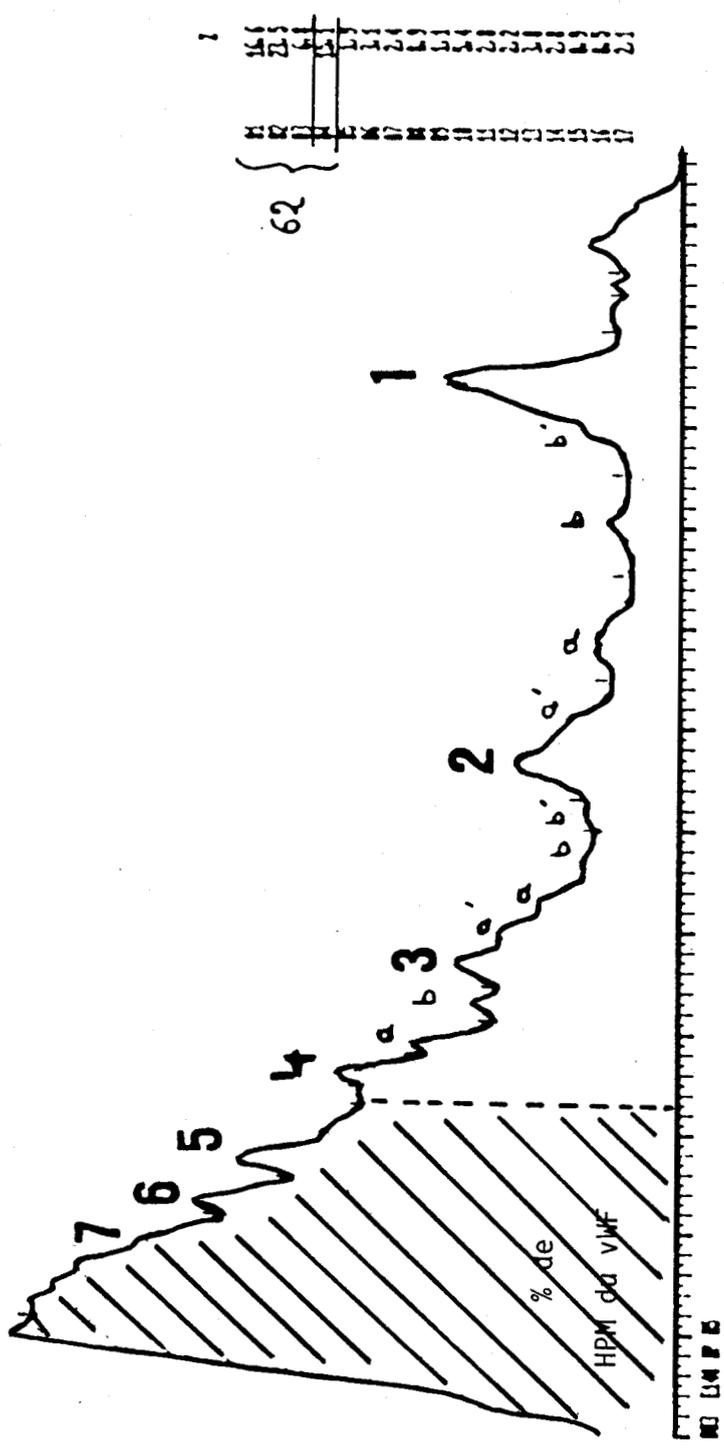


Figure 13 : ENREGISTREMENT DU PROFIL MULTIMERIQUE DU VWF PLASMATIQUE

RESULTATS PERSONNELS

Notre travail a été mené selon trois axes de recherche qui seront abordés successivement en rapportant d'abord les publications correspondantes et les expérimentations complémentaires. Chacune des trois parties de ce travail sera discutée séparément.

I - ETUDE DU ROLE DE LA COPULE GLYCANNIQUE DU vWF DANS L'ADHESION PLAQUETTAIRE

Notre laboratoire travaille depuis de nombreuses années sur le vWF et en particulier sur sa copule glycanique. Ainsi des travaux antérieurs faits au laboratoire ont montré que l'hydrolyse de l'acide sialique et d'une partie du galactose du vWF induisait une diminution de la fixation du vWF aux plaquettes en présence de ristocétine associée à une perte des HPM du vWF. Cependant, on peut se demander quelle est l'incidence de ces modifications dans un système physiologique. Il nous a donc semblé nécessaire d'étudier les propriétés de ce vWF modifié en utilisant le système de perfusion développé par Sakariassen.

Certains travaux ont été faits en collaboration avec l'équipe du Professeur Sixma à Utrecht et sont réunis dans l'article (accepté par la revue Blood) que nous présentons. D'autres résultats complémentaires seront présentés à la suite de cet article.

A. PUBLICATION (acceptée par Blood, Octobre 87) cft p. 59 à 88.

Revised manuscript 5-87-1-71 R

ADHESIVE PROPERTIES OF THE CARBOHYDRATE-MODIFIED VON WILLEBRAND FACTOR (CHO-VWF)

Augusto B. Federici*, Christophe De Romeuf°, Philip G. De Groot*, Bruno Samor°, Rossana Lombardi*, Patrizia D'Alessio*, Claudine Mazurier°, Pier Mannuccio Mannucci*, and Jan J. Sixma*

* Angelo Bianchi Bonomi Hemophilia Thrombosis Center, Department of Internal Medicine, University of Milano, Via Pace, 9, 20122 Milano, Italy

° Laboratoire de recherche sur l'hémostase, Centre Régional de Transfusion sanguine de Lille, France

• Department of Hematology, University Hospital, Utrecht, The Netherlands

This work has been carried out within the frame work of the concerted action "Thrombosis and disabilities" of the commission of the European Communities and was presented in part at the XIth International Congress on Thrombosis and Haemostasis, Brussels, Belgium, July 1987.

A.B. Federici was partially supported by a N.A.T.O. grant no. RG 85/0725, and by a grant of the Angelo Bianchi Bonomi Foundation. P. D'Alessio was supported in part by a grant of the Angelo Bianchi Bonomi Foundation for her two years fellowship at the Department of Hematology in Utrecht.

Address reprint requests to: Dr. A.B. Federici, Hemophilia Thrombosis Center, University of Milano, Via Pace, 9, 20122 Milano, Italy

Revised manuscript 5-87-1-71 R

ADHESIVE PROPERTIES OF THE CARBOHYDRATE-MODIFIED VON WILLEBRAND FACTOR (CHO-VWF)

Augusto B. Federici*, Christophe De Romeuf°, Philip G. De Groot*, Bruno Samor°, Rossana Lombardi*, Patrizia D'Alessio*, Claudine Mazurier°, Pier Mannuccio Mannucci*, and Jan J. Sixma*

* Angelo Bianchi Bonomi Hemophilia Thrombosis Center, Department of Internal Medicine, University of Milano, Via Pace, 9, 20122 Milano, Italy

° Laboratoire de recherche sur l'hémostase, Centre Régional de Transfusion sanguine de Lille, France

• Department of Hematology, University Hospital, Utrecht, The Netherlands

This work has been carried out within the frame work of the concerted action "Thrombosis and disabilities" of the commission of the European Communities and was presented in part at the XIth International Congress on Thrombosis and Haemostasis, Brussels, Belgium, July 1987.

A.B. Federici was partially supported by a N.A.T.O. grant no. RG 85/0725, and by a grant of the Angelo Bianchi Bonomi Foundation. P. D'Alessio was supported in part by a grant of the Angelo Bianchi Bonomi Foundation for her two years fellowship at the Department of Hematology in Utrecht.

Address reprint requests to: Dr. A.B. Federici, Hemophilia Thrombosis Center, University of Milano, Via Pace, 9, 20122 Milano, Italy

Abbreviations used in this paper:

vWF = von Willebrand Factor

CHO = carbohydrate

CHO-vWF = carbohydrate modified vWF

Native-vWF = glycoprotein with all the CHO

(Neu)-ase-vWF = vWF treated with neuraminidase

(Neu-Gal)-ase-vWF = vWF sequentially treated with neuraminidase and
beta-galactosidase

(Neu-Gal-eF)-ase-vWF = vWF sequentially treated with neuraminidase,
beta-galactosidase and endoglycosidase F

TBS = tris buffered saline

ABSTRACT

In this cooperative study we have explored the role of the carbohydrate moiety (CHO) of von Willebrand factor in supporting platelet adhesion. Because of previous discrepant results, all purifications steps and CHO modifications by various enzymes were critically evaluated. Under our conditions CHO-modified vWF preparations contained less than 5% of the initial sialic acid | (Neu)-ase-vWF | and less than 45% | (Neu-Gal)ase-vWF | or 21% | (Neu-Gal-eF)-ase-vWF | of the D-galactose. These preparations usually showed increased electrophoretic mobility but no significant loss of high molecular weight multimers when proteolysis had been prevented. Some degree of proteolysis was seen in some carbohydrate-modified vWFs but the degree of degradation observed did not correlate with the removal of D-galactose per se. Platelet adhesion to various matrices increased after removal of the terminal sialic acid | (Neu)-ase-vWF | and about 45% of the D-galactose | (Neu-Gal)-ase-vWF |, but returned to normal values when more than 70% of the total carbohydrate had been removed by endoglycosidase F | (Neu-Gal-eF)-ase-vWF |. These changes in reactivity were also reflected in the spontaneous aggregation in normal platelet rich plasma after CHO removal.

INTRODUCTION

Von Willebrand Factor (vWF) is a multimeric plasma glycoprotein which plays an important role in the early stages of hemostasis by promoting platelet adhesion to the subendothelium, especially at high shear rates (1-5). The carbohydrate moiety (CHO) composes about 15% of the total vWF mass (6-8) and is distributed on twenty two possible glycosylation sites that have been identified by cDNA (9,10) and by direct aminoacid sequencing (11). Critical roles for some sugars in the structure and function of vWF have been proposed by several authors (12-16). Some of us have found that D-galactose removal causes a loss of larger vWF multimers and a defect in the ristocetin-induced binding of vWF to platelets (17). Others of us have found that removal of D-galactose did not affect the multimeric structure although it made vWF much more sensitive to proteolysis (18). Furthermore, although there is information about platelet-vWF interactions from studies with purified vWF with different multimeric compositions and CHO contents (15-17), there are only few data about the relationship between CHO content and the ability of vWF to promote platelet adhesion (19).

In this multicenter study, vWF preparations with different modifications of CHO-side chains were prepared as previously described (17-18) by two groups (Milano and Lille). vWF was treated with (Neu)-ase, (Neu-Gal)-ase and (Neu-Gal-eF)-ase. The amounts of sugar removed, the multimeric patterns and the spontaneous aggregation when they were added to platelet rich plasma (PRP) were measured. The role of D-galactose was especially carefully investigated, since several groups have proposed a critical role for this sugar in the structure and function of vWF (12-17). Platelet adhesion to various subendothelial matrices in the presence of each vWF form was tested.

MATERIAL AND METHODS

Purification and Characterization of the Native vWF

vWF was purified from therapeutic cryoprecipitates by two different techniques in Milan and in Lille, as previously described (17, 18). For native purified vWF, the protein concentration, vWF antigen (vWF:Ag), (measured by electroimmunoassay (EIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) patterns), Ristocetin cofactor (Ricof), SDS-Polyacrylamide slab gel electrophoretic (PAGE) and SDS-agarose gel electrophoretic patterns of structures of the reduced and unreduced sample were determined (17,18). Milan vWF had a protein concentration of 0.5-2.5 mg/ml, with a specific activity of 106-128 U/mg of Ricof and 101-120 U/mg of vWF:Ag. Lille vWF had a protein concentration of 0.5-3.0 mg/ml, with specific activity of 86-89 U/mg of Ricof and 96-108 U/mg of vWF:Ag. Native purified vWFs from both laboratories showed a major subunit of 225 KDa in the 5% PAGE when the samples were reduced and the complete set of multimers with the typical "triplet pattern" when the samples were run in SDS-agarose gel electrophoresis techniques used in both laboratories (18,20). To compare the multimeric structures of the different CHO-vWFs determined in the two different laboratories by quite different techniques, autoradiographs were scanned with a Ultrascan-Laser Densitomer LKB equipped with an HP 3303 A integrator (LKB, Milan, Italy). Large multimers were arbitrarily defined as the last 6 peaks or as the peaks comprising 30% of the length of the gel starting from the cathodal origin. The underlying area was computed and expressed as a percentage of the total area of the gel.

Carbohydrate Modification and Analysis

Sialic acid was removed from native vWF in both laboratories as previously published (17,18). Neuraminidase | (Neu)ase | from *Vibrio Cholerae* (Calbiochem-Behring, Co) was used in Milan. (Neu)ase from *Clostridium perfringens* (Sigma Chemical, Co, type X) in Lille to prepare (Neu)-ase-vWF. D-galactose was removed from (Neu)-ase-vWF by beta-Galactosidase | (Gal)ase | from *Streptococcus pneumoniae* (gift of Dr. Gilbert Ashwell, National Institute of Health, Bethesda, MD) in both laboratories, although with different batches of the purified enzyme. Endoglycosidase F | (eF)ase | from *Flavobacterium meningosepticum* was obtained from New England Nuclear, Boston, MA and used in Milan as previously described (18).

After incubation with the enzymes, vWF was passed through chromatographic columns (Sephacrose 4B) equilibrated with physiological buffers; void volume fractions were pooled and immediately analyzed for protein concentration, carbohydrate content, multimeric structure, spontaneous aggregating activity in normal platelet rich plasma (PRP) and adhesion properties.

In Milan residual sialic acid was measured after hydrolysis for 60 min of vWF in 0.02 M H_2SO_4 at 80° C, using N-acetylneuraminic acid as a standard (21). D-galactose was determined after hydrolysis for 2 hours in 1 M hydrochloric acid at 100°C, by an enzymatic assay using galactose-dehydrogenase (22). Total hexose content of the vWF was measured by the phenol sulfuric method of Dubois et al. (23), using a mixture 1:1 of mannose and galactose as reference standard. In Lille, the sialic acid released was measured by the Warren micromethod (21). D-galactose was determined by the same enzymatic assay as above (22). Residual sialic acid and D-galactose were also measured by gas-liquid chromatography, as described by Zanetta et al (24).

Aggregation Studies

Blood was collected into 1:9 volume of 3.1% sodium citrate and centrifuged at 250 g for 10 min at room temperature to obtain platelet rich plasma (PRP). Aggregation studies were carried out at a final platelet concentration of 3×10^8 platelets per ml in normal PRP in a dual channel Lumiaggregometer (Chronolog, Co) in a 0.5 ml volume. The following concentrations of vWFs were tested in these aggregation studies: 5-85 ug/ml for (Neu)-ase-vWF, 10-80 ug/ml for (Neu-Gal)-asevWF and 5-100 ug/ml for native control-vWF and (Neu-Gal-eF)-ase-vWF. Lag phases and rates of aggregation were calculated by measuring the distance in mm between the baseline and the aggregation line 10 minutes after the addition of the different CHO-vWFs. Results were expressed as percent, with 100% being the aggregation induced by ADP.

Adhesion Studies

Platelet interactions with collagen and extracellular matrices in flowing blood were studied in a rectangular perfusion chamber (25). 5-10 ug/ml of the different native and CHO-vWF were added to platelets isolated and washed as described before (4) and resuspended either in human albumin solution or in the plasma of a patient with a severe von Willebrand's disease. Red blood cells were washed three times by 5 mM glucose. Prior to each perfusion run, the perfusate (15 ml) was reconstituted by adding washed and packed red cells to the resuspended platelets (hematocrit 0.4; platelet count 1.14×10^8 /ml, final concentration).

The following subendothelial matrices were used: non-fibrillar type I collagen, human smooth muscle cell matrices and human endothelial cell matrices obtained as previously published (25). In the experiments

with human endothelial cells, matrices were preincubated for one hour at room temperature with anti-vWF monoclonal antibodies completely blocking the interactions between vWF and platelet glycoprotein Ib (CLB-RAg 35, see reference 5). The coverslips were then inserted into the perfusion chamber and rinsed with 25 ml 10 mM HEPES- buffered saline, pH 7.4. The perfusate (15 ml) was prewarmed for 5 min at 37°C and recirculated through the perfusion chamber under nonpulsatile steady flow (26). The perfusions were performed for 5 min at a wall shear rate of 1300 sec.⁻¹. After each perfusion, the system was rinsed with HEPES-saline and fixed in glutaraldehyde as previously described (25). The platelet adhesion on the extracellular matrices was evaluated by light microscopy, after fixation with glutaraldehyde and staining with May-Grunwald-Giemsa. Platelet adhesion was expressed as the percentage of the surface covered by platelets; this was evaluated by "en face" light microscopy at 1000 times magnification (25). The light microscope was interfaced with an image analyzer (Quantimet 720, Imanco, Royston, U.K.): for every coverslip 10 fields, each consisting of 500,000 image points (0.028 mm² were selected at random and evaluated.

In some studies Indium - labeled platelets were used to investigate the adhesion to collagen. The techniques used for the procedure have been described previously (25,27).

Cross Experiments to Test The Role of The Penultimate D-Galactose

In order to prevent any possible bias and misunderstanding, cross experiments were organized in Utrecht as follows. Purified native vWF prepared in Milan and in Lille were treated by (Neu)ase and (Gal)ase under the conditions usually followed by each laboratory. Native controls,

(Neu)-ase-vWFs Milano/Milano and Lille/Lille (the first name indicating the source of the material, the second the procedure) and four different (Neu-Gal)-ase-vWFs, indicated as Milano/Milano, Milano/Lille, Lille/Milano and Lille/Lille, were investigated for D-galactose removal, percentage of HMW multimers, aggregation properties in PRP and platelet adhesion to various matrices.

Statistics

The statistical significance of differences between means was evaluated by the Student t test for non-paired data. All p,values less than 0.05 were accepted as statistically significant.

RESULTS

Structure and Function of the CHO-vWFs

Both laboratories were able to remove more than 95% of the total sialic acid with their (Neu)ases. The (Gal)ases from the same source employed by the two laboratories removed different amounts of D-galactose. Because of the different batches of the enzymes, residual D-galactose was 42-55% in Milan and 50-67% in Lille, meaning that no more than 58% of this sugar could be removed with (Gal)ase under our conditions. The addition of (eF)ase (Milan) allowed further removal of about 25% of the D-galactose (Table 1).

A typical multimeric pattern from Milan in an SDS-1.4% LGT-agarose gel electrophoresis is shown in Figure 1: all native and CHO-vWFs typically showed the complete set of multimers, but CHO-vWF had faster electrophoretic mobility than the native vWF because of removal of sugars, as is easily observed in the bands which compose the "triplet" in such a system. When the percentages of high molecular weight (HMW) multimers were calculated for the different preparations in Milan, no significant differences between native and CHO-vWFs were observed. In the Lille laboratory, neither the removal of the sialic acid nor the subsequent removal of galactose induced any marked change in the multimeric pattern, but the percentage of HMW multimers was significantly lower in (Neu-Gal)-ase-vWF than in native vWF (Table 1).

The aggregating properties of the different CHO-vWFs were tested in normal PRP within 5 hours after chromatography. No aggregation appeared within 20 minutes when up to 100 ug/ml of native or (Neu-Gal-eF)-ase-vWF were added to the PRP suspension (Table 1 and Figure 2, A and D). On the other hand, aggregation appeared after the addition of 5-65 ug/ml of (Neu)-ase-vWF and 20-88 ug/ml of (Neu-Gal)-ase-vWF, with the different aggregation rates and lag phases shown in Table 1 and Figures 2, B and C.

Adhesive Properties of the CHO-vWFs

The adhesive properties of the different CHO-vWFs, expressed as percent surface coverage, are summarized in Table 1 and Figure 3. In Lille, platelets labeled with ^{111}In were used and the results are expressed as number of platelets $\times 10^5/\text{cm}^2$. The coverage obtained after reconstitution with (Neu)-ase-vWF was significantly higher than after the addition of the native control in both Milan and Lille ($p < 0.001$). Addition of (eF)ase was able to remove more D-galactose, but about 25% of this sugar still remained. With the (Neu-Gal-eF)-ase-vWF so obtained the percentage of surface coverage was very close to that with the native control (Table 1).

When three different matrices (non-fibrillar type I collagen, smooth muscle cell matrices and endothelial cell matrices precoated with anti-vWF monoclonal antibodies) were tested in the perfusion system, all three showed increased adhesion in the presence of (Neu)-ase-vWF. However, differences among the preparations could be observed more clearly in the presence of smooth muscle cell matrices (Figure 3).

Cross Experiments

The results of the cross experiments performed for the two laboratories in Utrecht to test for the role of the penultimate D-galactose on vWF structure and function are summarized in Table 1. No differences between native and (Neu)-ase-vWF prepared under the conditions of Milan or Lille were found. When the 4 different (Neu-Gal)-ase-vWF were assayed for CHO content, smaller amounts of D-galactose had been removed with the procedures followed by Lille than with those followed by Milan for both the preparations from Milan and Lille (MI/MI and LI/MI versus MI/LI and LI/LI). The percentages of the HMW multimers and residual D-galactose were similar in LI/MI to those usually obtained in Lille for (Neu-Gal)-ase-vWF. On the other hand, the residual D-galactose was higher than usual for the LI/LI preparation. The multimeric patterns of the different native and CHO-vWF are shown in Figure 4.

Aggregating and adhesive properties of these two samples were consistent with the results obtained in Lille. Preparations by Milan showed significant degradation as measured by the reduced percentage of the HMW multimers (Fig.4). However, the loss of HMW forms did not correlate with the removal of D-galactose per se since there was degradation in both the MI/MI and MI/LI (Neu-Gal)-ase-vWF samples containing different percents of remaining sugar. On the other hand, similar amounts of HMW multimers were observed in both LI/LI and LI/MI samples where different concentrations of D-galactose remained. Interestingly, the aggregating properties and the increased adhesion in preparation MI/LI had been completely abolished or were significantly lower than usual in preparation MI/MI (Table 1).

DISCUSSION

Human vWFs is a multivalent protein composed of identical subunits (8). CHO residues have been identified in these subunits (6-8) and the structures of some CHO chains have been published (28-30). The aim of this study was to investigate the role of the penultimate D-galactose in the structure and function of vWF. Previously, some of us found that removal of D-galactose did not affect the multimeric structure, although it made vWF much more sensitive to proteolysis (18), whereas others of us found that D-galactose removal caused loss of the larger multimers and a defect in ristocetin induced binding of vWF to platelets(17). In order to solve these discrepancies, cross experiments were organized in Utrecht, in which CHO content, multimeric analysis, spontaneous aggregating properties in normal PRP and adhesion properties of the different CHOvWFs preparations were jointly and simultaneously tested. The results of these cross experiments were compared with those obtained separately in each laboratory (Table 1).

During the cross experiments, investigators from Milan and Lille freshly prepared CHO-vWFs from the two different native purified vWFs by enzymatic treatment according to their own protocols. Samples were exchanged for analysis of CHO content and multimers and tested within 4 hours for aggregating and adhesive properties with the same normal platelets. While sialic acid removal was almost always complete, the removal of D-galactose was not the same under the conditions used in the two laboratories, even though the same kind of (Gal)ase was employed (Table 1c). Apparently the batch from Milan was more effective. The less efficient removal of D-galactose in samples MI/LI and LI/LI can be explained by the partial inactivation of the (Gal)ase used by Lille in Utrecht. In fact, Milan and Lille had almost the same D-galactose removal when the (Neu-Gal)-ase-vWF were prepared in Milan and Lille (Table 1, a-b). Interestingly, no more than 55% of D-galactose could be removed, as

previously reported for (Gal)ase from another source (17); the persistence of D-galactose residues can be explained by the beta 1-3 linked galactose in O-glycan (30). Our data seem to be in contrast with those published by Gralnick (14), who removed more than 80% of D-galactose with (Gal)ase from the same source as ours. In our hands, this degree of removal could be obtained only by using (Gal)ase and (eF)ase (18) together.

Except for an increased electrophoretic mobility of each multimer, non significant changes were observed in the HMW multimers in most of the (Neu-Gal)-ase-vWF and (Neu-Gal-eF)-ase-vWF preparations, whether 33 or 78% of D-galactose had been removed (figure 1 and Table 1a). However in some preparations of (Neu-Gal)-ase-vWF from Lille (Table 1b) and in MI/MI as well as in MI/LI during the cross experiments (Table 1 c), the amount of the HMW multimers appeared to be reduced (Figure 4). Some degradation may have occurred in these cases. However the loss of the HMW multimers was not correlated with the removal of the D-galactose per se, since most CHO-vWFs, whatever the amount of sugar removed, had multimeric patterns almost identical to their native controls (Table 1 a, c).

A possible explanation for the loss of HMW multimers in such cases could be that there were proteases present during the preparation of native and CHO-vWFs. Some of us have recently shown that degradation of the HMW forms may occur during CHO modification for two main reasons: the presence of trace amounts of proteases, either in the vWF preparations or in the enzyme mixture used for the removal of the CHO (18, 35) or changes in buffers (presence of calcium ions and basic pHs) or storage (temperature and freezing and thawing) conditions (32). These considerations should be borne in mind when structure-function relationship studies are performed for CHO-vWFs. A normal multimeric structure

is necessary for the interactions of the CHO-vWFs with platelets and subendothelium: in fact, when there was a significant degradation of the HMW multimers in (Neu-Gal)-ase-vWF, as in MI/MI and MI/LI (Table 1 c), the spontaneous aggregation typically observed with (Neu)-ase-vWF disappeared and the concomitantly increased adhesion returned to values equal to or lower than those of the native vWF.

The functions of the different CHO-vWFs was investigated, by studying aggregation in normal PRP and platelet adhesion to different subendothelial matrices. When possible, the platelets in the PRP and in the perfusates were from the same normal donor. For the aggregating properties in normal PRP, the maximal spontaneous aggregation of (Neu)-ase-vWF was similar to that shown by De Marco and Shapiro (31). (Neu-Gal)-ase-vWF still retained this spontaneous aggregation, though delayed and less intensive while (Neu-Gal-eF)-ase-vWF, containing 21% of the D-galactose and about 30% of the total sugar, behaved like the native control vWF (Figure 2). These data can be explained by changes in charge after the sequential removal of sialic acid (two galactose exposed), of about 50% of the D-galactose by (Gal)ase (one D-galactose and one N-acetyl-glucosamine exposed) and after the removal of the N-linked CHO chains by the addition of (eF)ase (one L-fucose and one N-acetyl-glucosamine exposed). However, conformational modifications of the receptor's sites on the CHO chain after removal of CHO can not be excluded; these conformational changes might also be responsible for the greater sensitivity to proteases and the lower solubility of the CHO-vWFs (32). Instead of Ristocetin cofactor we preferred to use aggregating properties because they could be related much easier with platelet adhesion by using platelets from the same sources. In fact (Neu)-ase-vWF shows usually the same Ristocetin cofactor activity (Ricof) as native control in spite of its spontaneous aggregation in normal PRP (18, 31). Nevertheless, Ricof was compared with vWF antigen (vWF:Ag) by some of us in the different CHO-vWFs, but no significant changes were observed between native and (Neu-Gal-eF)-ase-vWF (18, 32).

The adhesive properties of the CHO-vWFs were tested in the flat perfusion chamber devised by Sakariassen (25). This system is particularly useful for reconstituted blood used with different matrices. Non fibrillar collagen and several subendothelial matrices were tested to find out the ideal conditions for the analysis of the CHO-vWF forms. The shear rate of 1300 sec^{-1} was chosen for these experiments because platelet adhesion to the used matrices is dependent on vWF at this shear rate (3). Adhesion was greater with (Neu)-ase-vWF than with its native control (Table 1). Recently Lawrence and Gralnick suggested that asialo-vWF has an inhibitory effect on platelet adhesion (33) but Ordinas et al. found increased adhesion in the presence of asialo-vWF, similar to that we observed with our (Neu)-ase-vWF preparations (34). Adhesion was increased in our hands when (Neu-Gal)-ase-vWF with 50% of the D-galactose removed was added to the perfusate. On the other hand, the adhesion in the presence of (Neu-Gal-eF)-ase-vWF was very similar to that induced by its native control (Table 1).

Among the different subendothelial matrices tested, smooth muscle cell matrices gave clearer results than collagen or endothelial cell matrices precoated with anti-vWF monoclonal antibodies. Therefore it may be better to use smooth muscle cells for studies with purified vWF, since there is usually no vWF in smooth muscle cells and no precoating with monoclonal antibodies is required, and the surface is more adhesive than sprayed non fibrillar collagen (figure 3).

In summary, our cooperative study has demonstrated that the exposure of the penultimate D-galactose is important for the appearance of in vitro aggregating properties and for the enhancement of adhesion of vWF. Subsequent removal of galactose residues can reduce both these aggregating and adhesive properties but after further modification of the CHO chains by (eF)ase, functions similar to those of native vWF return. Therefore, we conclude that the removal of some sugars, with the consequent exposure of others, can concomitantly modify both vWF platelet interactions and platelet adhesion to the subendothelium.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr. Gilbert Ashwell for kindly providing the beta-Galactosidase, Dr. Jan van Mourik for providing the monoclonal antibodies towards vWF, Dr. Marco Moia and Dr. Patrizia Della Valle for the purification of nonfibrillar collagen type I and III, Mrs Mieke Ottenhof-Rovers for excellent technical assistance during the perfusion experiments in Utrecht. G.L.C analysis were performed in the laboratory of prof Jean Montreuil, to whom we express our gratitude.

We thank also Mrs. Annemieke Beijer, Maeyken Hoeneveld and Marina Wildt Meyboom for the preparation of the manuscript in Utrecht and Dr. Betty Rubin for revision of the English.

REFERENCES

1. Zimmerman TS, Ruggeri ZM, Fulcher CA: Factor VIII-von Willebrand factor. In *Progress in Hematology*, vol. XIII (Brown EB, ed). Grune & Stratton Inc. 1983, p. 279
2. Tschopp TB, Weiss HJ, Baumgartner HR: Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrand's disease. *J. Lab Clin Med* 83: 296, 1974
3. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HS: Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood. I. Shear rate dependent decrease of adhesion in von Willebrand' disease and Bernard-Soulier Syndrome. *J Lab Clin Med* 92: 750, 1978
4. Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ: Human blood platelet adhesion to artery subendothelium. *Nature* 279: 636, 1979
5. Stel HV, Sakariassen KS, De Groot PG, von Mourik JA, Sixma JJ: Von Willebrand factor in the vessel wall mediates platelet adherence. *Blood* 65: 85, 1985
6. Sodetz JM, Paulson JC and McKee PA: 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
7. Samor B, Mazurier C, Goudemand M, Debeire P, Fournet B and Montreuil J: Preliminary results on the carbohydrate moiety of factor VIII/von Willebrand factor (VIII/vWF) - *Thromb Res* 25: 81, 1982

8. Chopek MW, Girma JP, Fujakawa K, Davie EW and Titani K: Human von Willebrand Factor: A multivalent protein composed of identical subunits. *Biochemistry* 25: 3146, 1986
9. Verweij CL, Dirgearde PJ, Hart M, Pannekoek H: Full-length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than mature vWF subunit. *EMBO J* 5: 1839, 1986
10. Bonthron D, Orr EC, Mitsock LM, Ginsburg D, Handin RI, Orkin SH: Nucleotide sequence of pre-pro von Willebrand factor cDNA. *Nucleic Acids Res* 14: 7125, 1986
11. Titani K, Kumar S, Takio K, Ericsson LH, Wade RD, Ashida K, Walsh KA, Chopek JE, Fujikawa F: Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* 25: 3171, 1986
12. Sodetz JM, Pauson JC, Pizzo SV, McKee PA: Carbohydrate of human factor VIII-von Willebrand factor. Impairment of function by removal of specific galactose residues. *J Biol Chem* 253: 7202, 1978
13. Galnick HR: Factor VIII-von Willebrand factor protein. Galactose, a cryptic determinant of von Willebrand factor activity. *J Clin Invest* 62: 496, 1978
14. Galnick HR, Williams SB, Rick ME: Role of carbohydrate in multimeric structure of factor VIII-von Willebrand factor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2771, 1983

15. Kao KJ, Pizzo SV, McKee PA: Factor VIII-von Willebrand factor Modifications of its carbohydrate causes reduced binding to platelets. *J Biol Chem* 255: 10134, 1980
16. Gralnick HR, Williams SB, Morisato DK: Effect of the multimeric structure of the factor VIII-von Willebrand factor protein on binding to platelets. *Blood* 58: 387, 1981
17. Goudemand J, Mazurier C, Samor B, Bouquelet S, Montreuil J, Goudemand M: Effect of carbohydrate modifications of factor VIII-von Willebrand factor on binding to platelets. *Thromb Haemost* 537:390, 1984
18. Federici AB, Elder JH, De Marco L, Ruggeri ZM, Zimmerman TS: Carbohydrate moiety of von Willebrand factor is not necessary for maintaining multimeric structure and ristocetin cofactor activity but protects from proteolytic degradation. *J Clin Invest* 74: 2049, 1984
19. Sixma JJ, Sakariassen KS, Beeser-Visser NH, Ottenhof-Rovers M, Bolhuis PA: Adhesion of platelets to human artery subendothelium: effect of factor VIII-von Willebrand factor of various multimeric composition. *Blood* 63: 128, 1983
20. Mazurier C, Samor B, Goudemand M.: Improved characterization of plasma von Willebrand factor heterogeneity when using 2.5% Agarose gel electrophoresis. *Thromb Haemostas* 55: 61, 1986
21. Warren L: The thiobarbituric acid assay for sialic acids. *J Biol Chem* 234: 1971, 1959

22. Finch PR, Yuen R, Schachter H, Moscarello MA: Enzymatic methods for the micro assay of D-mannose, D-glucose, D-galactose and L-fucose from acid hydrolysates of glycoproteins. *Anal Biochem* 31: 296, 1969
23. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350, 1956
24. Zanetta JP, Breckenridge WC, Vincendon G: Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methylglycosides as trifluoroacetate derivatives. Application to glycoproteins and glycolipids. *J Chrom* 69: 291, 1972
25. Sakariassen KS, Aerts PAMM, De Groot PG, Houdijk WPM, Sixma JJ: A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrices and purified components. *J Lab Clin Med* 102: 522, 1983
26. Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ: Platelet adherence to subendothelium of human arteries in pulsatile and steady flow. *Thromb Haemostasis* 42: 1473, 1980
27. Heyns A du P, Badenhorst PN, Pieters H, Lotter MG, Minnaar PC, Duyvene de Wit LJ, Van Reene O, Retief FP: Preparation of a viable population of Indium-111-labeled human blood platelets *Thromb Haemostasis* 42: 1473: 1980
28. Debeire P, Michalski JC, Debray H, Mazurier C, Goudemand M, Van Halbeek H, Vliegthart JFG, Montreuil J: Structure determination of the major asparagin-linked sugar chain of human factor VIII-von Willebrand factors. *FEBS Lett* 151: 22, 1983

29. Samor B, Michalski JC, Debray H, Mazurier C, Goudemand M, Van Halbeek H, Vliegenthart JFG, Montreuil J: Primary structure of a new tetra-antennary glycan of the N-acetyllactosaminic type isolated from human factor VIII/von Willebrand factor. Eur J Biochem 158: 295, 1986
30. Samor B, Michalski JC, Strecker G, Mazurier C, Goudemand M, Van Halbeek H, Vliegenthart JHG, Montreuil J: Primary structure of the major O-glycan from human von Willebrand factor. Proceedings of the IXth International Symposium on Glycoconjugates, Lille, July 6-11, 1987. abstract A42
31. De Marco L, Shapiro SS: Properties of Human Asialo-Factor VIII. A ristocetin-independent platelet-aggregating agent. J Clin Invest 68: 321, 1981
32. Federici AB, Mannucci PM, Lombardi R, Lattuada A, Colibretti ML, Berkowitz SD and Zimmerman TS: Circulating and Cellular proteinases as well as storage conditions can induce degradation of the carbohydrate - modified von Willebrand Factor. Submitted to Thrombosis and Haemostasis
33. Lawrence JB and Gralnick HR: Asialo von Willebrand Factor inhibits platelet adherence to human arterial subendothelium despite its enhanced ristocetin cofactor activity and its capacity to induce platelet aggregation. Blood 68: suppl. 1, 1986, abstract 1160
34. Ordinas A, Bastida E, Garrido M, Monteagudo J, De Marco L and Castillo R: Asialo von Willebrand factor enhances platelet adhesion to vascular subendothelium. Thrombosis and Haemostasis 58: vol 1, 1987 abstract 1299
35. Federici AB, Berkowitz SD: Carbohydrate prevents loss of large von Willebrand Factor Multimers by protecting against amino terminal proteolytic cleavage. Thrombosis and Haemostasis 58: vol 1, 1987 abstract 74

FIGURE LEGENDS

Figure 1

SDS-gel electrophoresis in 1.4% low gelling temperature (LGT) agarose. The samples shown from the left to the right are native vWF (A), (Neu)-ase-vWF (B), (Neu-Gal)-ase-vWF (C) and (Neu-Gal-eF)-ase-vWF (D). The arrow at the top indicates the interface between stacking and running gel; marker bars denote the "triplet pattern" of the different purified vWFs with or without CHO. Note the increased mobility proportional to the amount of sugar removed.

Figure 2

Aggregation curves obtained in normal citrated (3.1%) platelet rich plasma (PRP) with different vWF preparations. After 30 seconds of baseline in the aggregometer, 10-100 ug of different CHO-vWF were added to 250 ul of normal PRP (platelet concentration 3×10^8 /ml). Increased light transmission was evaluated until the second wave of aggregation ended or within 10 minutes if no aggregation appeared. Concentrations of the different CHO-vWFs were also critical: 2-20 ug/ml of (Neu)-ase-vWF was able to induce 85% of maximal aggregation (B) while 20-80 ug/ml of (Neu-Gal)-ase-vWF (C) produced 55% of maximal aggregation. There was no aggregation in the presence of native control vWF (100 ug/ml) (A) or (Neu-Gal-eF)-ase-vWF.

Figure 3

Summary of the adhesion properties of the different CHO-vWF, expressed as percentage of surface coverage with different subendothelial matrices. The three different groups of histograms represent the three matrices tested. From left to right: non-fibrillar collagen type I (Co I NF), human smooth muscle cell matrices (SMC Ma) and human endothelial cell matrices precoated with monoclonal antibodies against vWF (EC Ma). In each histogram, different symbols are used to differentiate the CHO-vWF added to the perfusate. From left to right: normal plasma (empty square), severe von Willebrand's disease plasma or human albumin solution (hatched lines), native control vWF added to the severe vWd plasma (vertical lines) (Neu)-ase-vWF added to severe vWd plasma (dotted bar) and (Neu-Gal)-ase-vWF added to severe vWd (cross-hatched). Mean values \pm standard deviation * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 4

SDS-gel electrophoresis in 1.4% LGT agarose (see legend to fig. 1). The sample shown from left to right were obtained during cross experiments and are as follows: native vWF MI/MI (1), (Neu-Gal)-ase-vWF LI/LI (2), (Neu-Gal)-ase-vWF MI/LI (3), native vWF LI/LI (4), (Neu-Gal)-ase-vWF MI/MI (5), (Neu-Gal)-ase-vWF LI/MI (6).

Percents HMW multimers were evaluated from this gel by densitometric scanning and data are reported in Table 1.

Table 1
SUMMARY OF RESULTS (MEAN ± S.D.) ON THE STRUCTURE
AND FUNCTION OF DIFFERENT CHO-vWFs

vWF Forms tested (n)	Residual D-galactose (%)	High Mol. Weight multimers (%)	Induced aggregation in normal PRP			Surface coverage (%)
			Rate (%)	Lag phase (sec.)	Concentration (ug/ml)	
In Milano (a)						
- Native 10	100	43.08±5.6	0	> 1200	5-100	15.4±2.6
- (Neu.)-ase 10	98.6±1.4	44.85±9.3	78.5±8.7***	12±8	5-65	23.8±3.2***
- (Neu-Gal) - - ase 8	43.2±3.2***	39.1±8.7	37.8±6.9**	132±45	20-80	19.7±2.9**
- (Neu-Gal eF) - ase 3	25.7±3.6***	40.2±5.2	0	> 1200	5-100	13.5±2.2
In Lille (b)						
- Native 5	100	50.2±6	0	> 1200	30	17.9±3
- (Neu)-ase 5	100	45.0±7	80.0±4***	17±14	30	27.3±4***
- (Neu-Gal) - - ase 5	57.3±6.7***	31.9±10**	70.0±4.8***	178±41	30	27.2±5.6***
During cross experiments (c)						
- Native MI/MI	100	54.9	0	> 1200	5-100	13.32±3.1
- Native LI/LI	100	57.3	0	> 1200	5-100	10.4±2.4
- (Neu)-ase MI/MI	100	NO	82***	0	38-60	24.55±7.2***
- (Neu)-ase LI/LI	100	NO	82***	0	38-60	18.32±5.3**
- (Neu-Gal) - - ase - MI/MI	45.2±2.1***	11.9***	35**	360	16	13.6±1.71
- MI/LI	73.4±8.9*	21.9**	0	> 360	16	8.1±1.91
- LI/LI	71.8±6.8*	37.7*	76***	0	88	27.1±0.48***
- LI/MI	44.8±2.9***	38.5*	55***	240	80	20.1±0.49**

* p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001

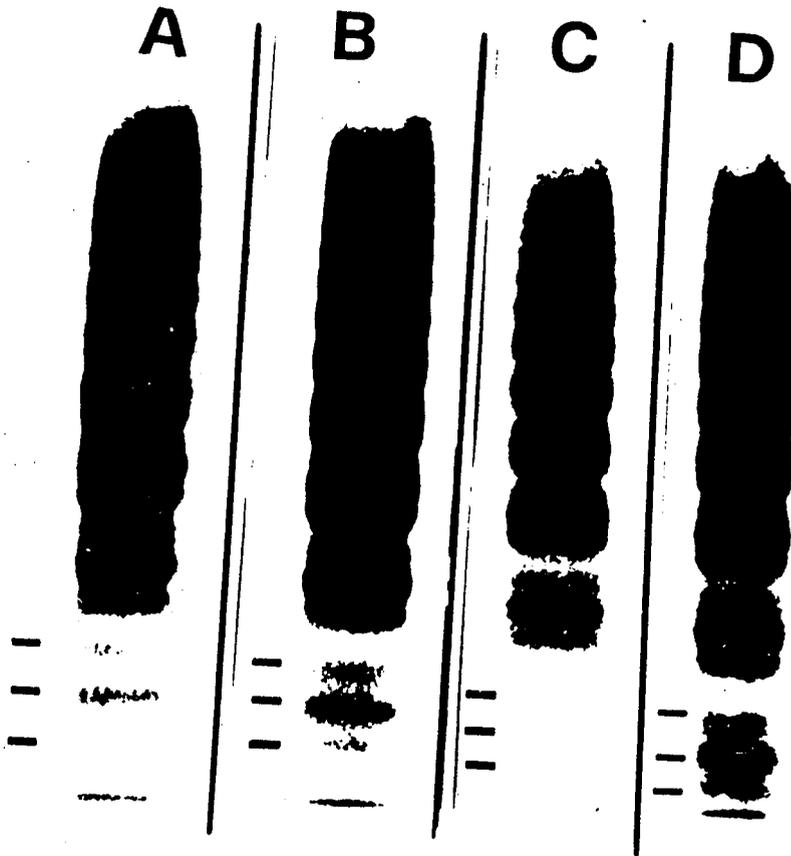


Figure 1

SDS-gel electrophoresis in 1.4% low gelling temperature (LGT) agarose. The samples shown from the left to the right are native vWF (A), (Neu)-ase-vWF (B), (Neu-Gal)-ase-vWF (C) and (Neu-Gal-eF)-ase-vWF (D). The arrow at the top indicates the interface between stacking and running gel; marker bars denote the "triplet pattern" of the different purified VWFs with or without CHO. Note the increased mobility proportional to the amount of sugar removed.

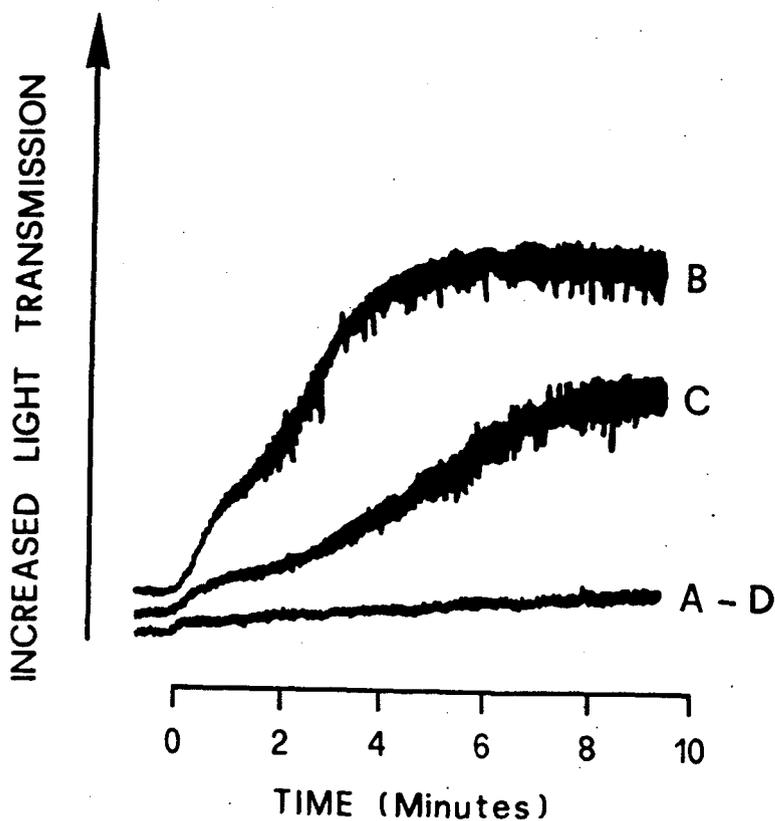


Figure 2

Aggregation curves obtained in normal citrated (3.1%) platelet rich plasma (PRP) with different vWF preparations. After 30 seconds of baseline in the aggregometer, 10-100 ug of different CHO-vWF were added to 250 ul of normal PRP (platelet concentration 3×10^8 /ml). Increased light transmission was evaluated until the second wave of aggregation ended or within 10 minutes if no aggregation appeared. Concentrations of the different CHO-vWFs were also critical: 2-20 ug/ml of (Neu)-ase-vWF was able to induce 85% of maximal aggregation (B) while 20-80 ug/ml of (Neu-Gal)-ase-vWF (C) produced 55% of maximal aggregation. There was no aggregation in the presence of native control vWF (100 ug/ml) (A) or (Neu-Gal-eF)-ase-vWF.

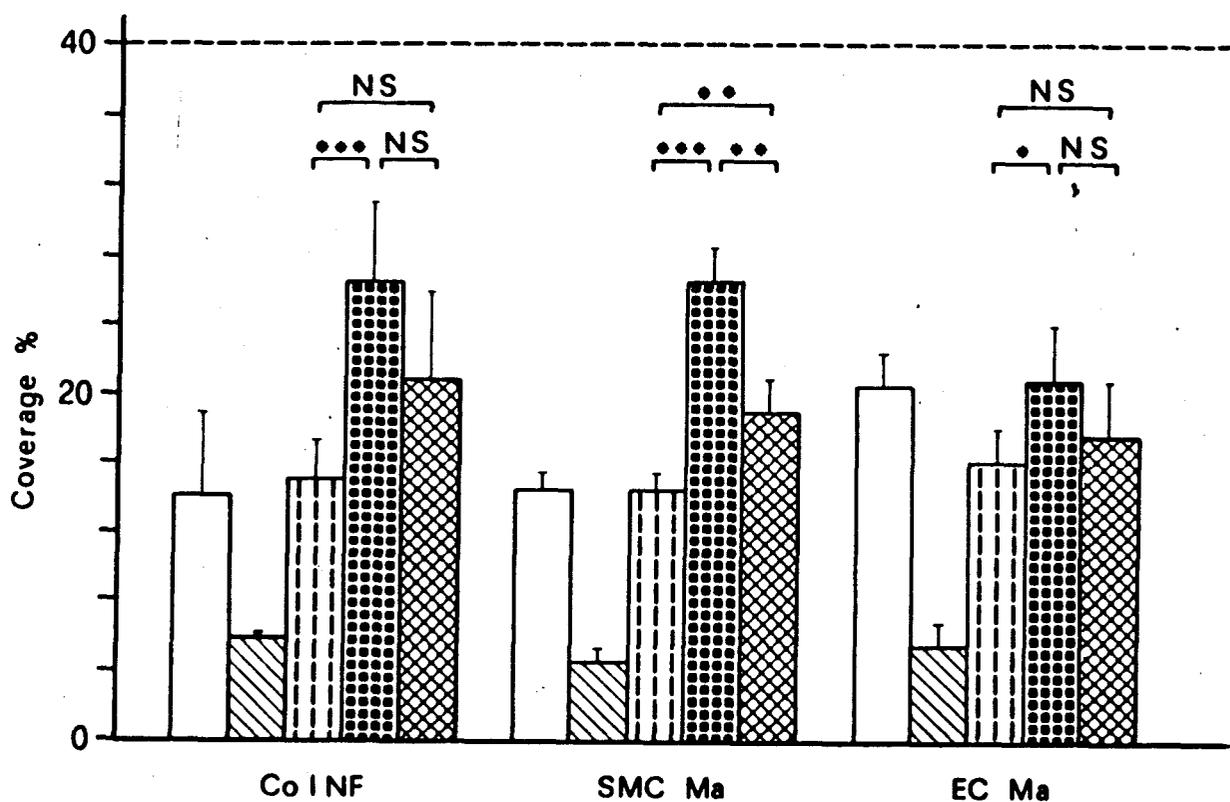


Figure 3

Summary of the adhesion properties of the different CHO-vWF, expressed as percentage of surface coverage with different subendothelial matrices. The three different groups of histograms represent the three matrices tested. From left to right: non-fibrillar collagen type I (Co I NF), human smooth muscle cell matrices (SMC Ma) and human endothelial cell matrices precoated with monoclonal antibodies against vWF (EC Ma). In each histogram, different symbols are used to differentiate the CHO-vWF added to the perfusate. From left to right: normal plasma (empty square), severe von Willebrand's disease plasma or human albumin solution (hatched lines), native control vWF added to the severe vWd plasma (vertical lines) (Neu)-ase-vWF added to severe vWd plasma (dotted bar) and (Neu-Gal)-ase-vWF added to severe vWd (cross-hatched). Mean values \pm standard deviation * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

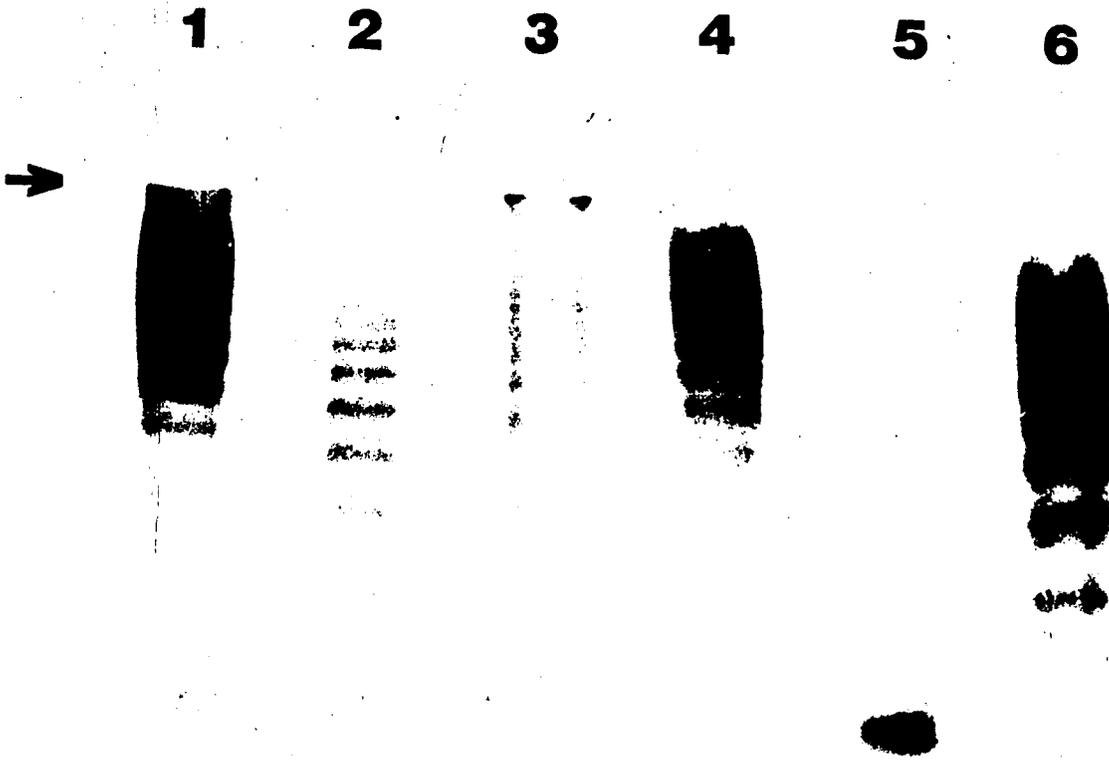


Figure 4

SDS-gel electrophoresis in 1.4% LGT agarose (see legend to fig. 1). The sample shown from left to right were obtained during cross experiments and are as follows: native vWF MI/MI (1), (Neu-Gal)-ase-vWF LI/LI (2), (Neu-Gal)-ase-vWF MI/LI (3), native vWF LI/LI (4), (Neu-Gal)-ase-vWF MI/MI (5), (Neu-Gal)-ase-vWF LI/MI (6).

Percents HMW multimers were evaluated from this gel by densitometric scanning and data are reported in Table 1.

B. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

1) Lien avec les résultats antérieurs du laboratoire

Dans l'article ci-dessus, nous montrons que l'adhésion plaquettaire est augmentée lorsque le vWF natif est désialylé [(Neu-ase)] vWF ou désialylé puis partiellement dégalactosylé [(Neu-Gal)ase] vWF par la bêtagalactosidase de *Streptococcus pneumoniae* en présence d'inhibiteur de protéases.

Comme nous l'avons déjà dit en début de ce chapitre, d'autres travaux antérieurs faits au laboratoire ont montré que le (Neu-Gal)ase vWF obtenu après action d'une bêtagalactosidase de *Jack Bean* ou d'*Aspergillus Niger* avait une fixation aux plaquettes diminuée en présence de ristocétine et une fixation normale en présence de thrombine (Goudemand et al., 1985).

De façon à savoir si les préparations qui induisent l'augmentation de l'adhésion plaquettaire ont les mêmes propriétés de fixation aux plaquettes que celles observées sur des préparations antérieures, nous avons, après avoir radiomarké les différentes préparations de vWF natif et modifié, effectué simultanément ces expériences d'adhésion plaquettaire et de fixation aux plaquettes.

Les résultats obtenus (Tableau I) confirment tout d'abord que l'adhésion plaquettaire est augmentée avec le (Neu-ase) vWF et le (Neu-Gal)ase vWF et que l'agrégation du (Neu-Gal)ase vWF est modifiée vis-à-vis du (Neu-ase)vWF (Fig.14), comme nous venons de le montrer dans l'article p. 70. Il semble de plus que la fixation du (Neu-ase)vWF au collagène dans le système de perfusion soit légèrement augmentée comme nous avons pu le vérifier ultérieurement sur un plus grand nombre d'échantillon ($134 \% \pm 33$ contre 100 ± 27 pour le vWF natif, $n = 12$, $(p < 0.05)$) alors que celle du (Neu-Gal)ase vWF est légèrement diminuée.

D'autre part, les résultats de fixation des préparations de vWF aux plaquettes confirment les travaux antérieurs (Goudemand et al., 1985) à savoir que :

- la fixation du (Neu-ase) vWF en présence de ristocétine n'est pas modifiée,
- la fixation du (Neu-ase) vWF en présence de thrombine est augmentée,
- la fixation du (Neu-Gal)ase vWF en présence de ristocétine est diminuée.

	% Adhésion plaquettaire *	% Fixation du vWF au collagène **	Fixation du vWF aux plaquettes % fixation de radioactivité		Cofacteur de la ristocétine U/mg
			Ristocétine I/mg/ml	Thrombine 0.2 U/ml	
natif	n=3 50 %	n=3 100 %	n=2 39.7	n=2 12.47	50
Neu-ase	n=3 92 %	n=3 125 %	n=2 38.5	n=2 16.8	49
(Neu-Gal)ase	n=3 94 %	n=3 88 %	n=2 21.2	n=2 19.9	6

Tableau I : Résultats obtenus à partir d'une même préparation de vWF natif ou modifié (Neu-ase, (Neu-Gal)ase), avec différentes techniques :

- 1) - Adhésion des plaquettes au collagène I, III nf $\chi = 1\ 300\ sec^{-1}$ tps = 3 min
- 2) - Fixation du vWF natif ou modifié au collagène I, III nf dans le système de perfusion
- 3) - Fixation du vWF natif ou modifié aux plaquettes en présence de ristocétine (1 mg/ml) et de thrombine (0.2 U/ml)
- 4) - Dosage du cofacteur de la ristocétine

* voir p. 53

** voir p. 56

Néanmoins la diminution observée est moins importante (47 %) que celle trouvée antérieurement (90 %).

Par contre nos résultats ne concordent pas au sujet de la fixation du (Neu-Gal)ase vWF en présence de thrombine, puisque nous trouvons une augmentation de cette fixation alors que les travaux antérieurs avaient montré une légère diminution. Le cofacteur de la ristocétine du Neu ase vWF n'est pas changé par rapport à celui du vWF natif alors qu'il est fortement diminué pour le (Neu-Gal)ase vWF.

2) Utilisation d'une β -galactosidase d'origine différente

En complément des expériences d'adhésion plaquettaire faites en utilisant la β -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae*, nous avons voulu faire des expériences complémentaires avec d'autres enzymes et en particulier avec celle de *Bifidobacterium bifidum* (purifiée par S. Bouquelet et utilisé à 37.5 mU par mg de vWF 3 h à 37°C).

L'adhésion plaquettaire obtenue en présence du (Neu-Gal)ase vWF ainsi préparé est supérieure à celle du vWF natif mais diminuée par rapport à celle du Neu ase vWF (Tableau II). Aussi, l'agrégation de ce (Neu-Gal)ase vWF est plus fortement modifiée qu'avec l'enzyme de *Streptococcus pneumoniae*. En effet, on observe en plus de l'augmentation du temps de latence (242 sec.), une plus forte diminution de l'intensité qui se situe entre 87 et 11 % suivant la préparation (Fig. 14).

Le pourcentage de galactose libéré à partir du Neu ase vWF est de $43 \% \pm 8.9$ (n = 7). En ce qui concerne les multimères du vWF, on observe une diminution des HPM après action de la galactosidase, puisque le pourcentage de HPM supérieur ou égal à la bande 5 passe de 58.9 à 38.2 (Fig.15). Cette diminution des HPM est vérifiée à chaque hydrolyse, ce qui n'est pas le cas lorsque l'on utilise la β -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae* avec laquelle les résultats des multimères sont fort variables comme nous pouvons le voir sur les figures 16 et 17. De plus, il ne semble pas que cette différence soit due à la différence du taux de galactose libéré puisqu'il est de 46 % pour l'expérience présentée sur la figure 15 et de 48 % pour celle de la figure 17.

3) Utilisation d'une galactose oxydase

L'étude du rôle du galactose du vWF et du (Neu-ase)vWF a été

	% adhésion plaquettaire		
	A N=4	B N=3	C n=7
vWF natif	69.5 ± 25	50 ± 13.6	61 ± 23
(Neu-ase) vWF	nd	92.7 ± 16	-
(Neu-gal)ase vWF	98 ± 22	75.6 ± 9.7	88.6 ± 21
% libération galactose	45 ± 6	41 ± 9	43 ± 8.9

A : moyenne de 4 expériences différentes
 B : moyenne de 3 expériences différentes
 C : moyenne des 7 expériences différentes

Tableau II : Adhésion des plaquettes au collagène I, III non fibrillaire humain en présence de vWF natif ou modifié par des exoglycosidases ($\gamma = 1\ 300\ \text{SEC}^{-1}$, $t = 3\ \text{min}$)
 (Neu-ase : *Vibrio cholerae*, Gal-ase : *Bifido bacterium*)

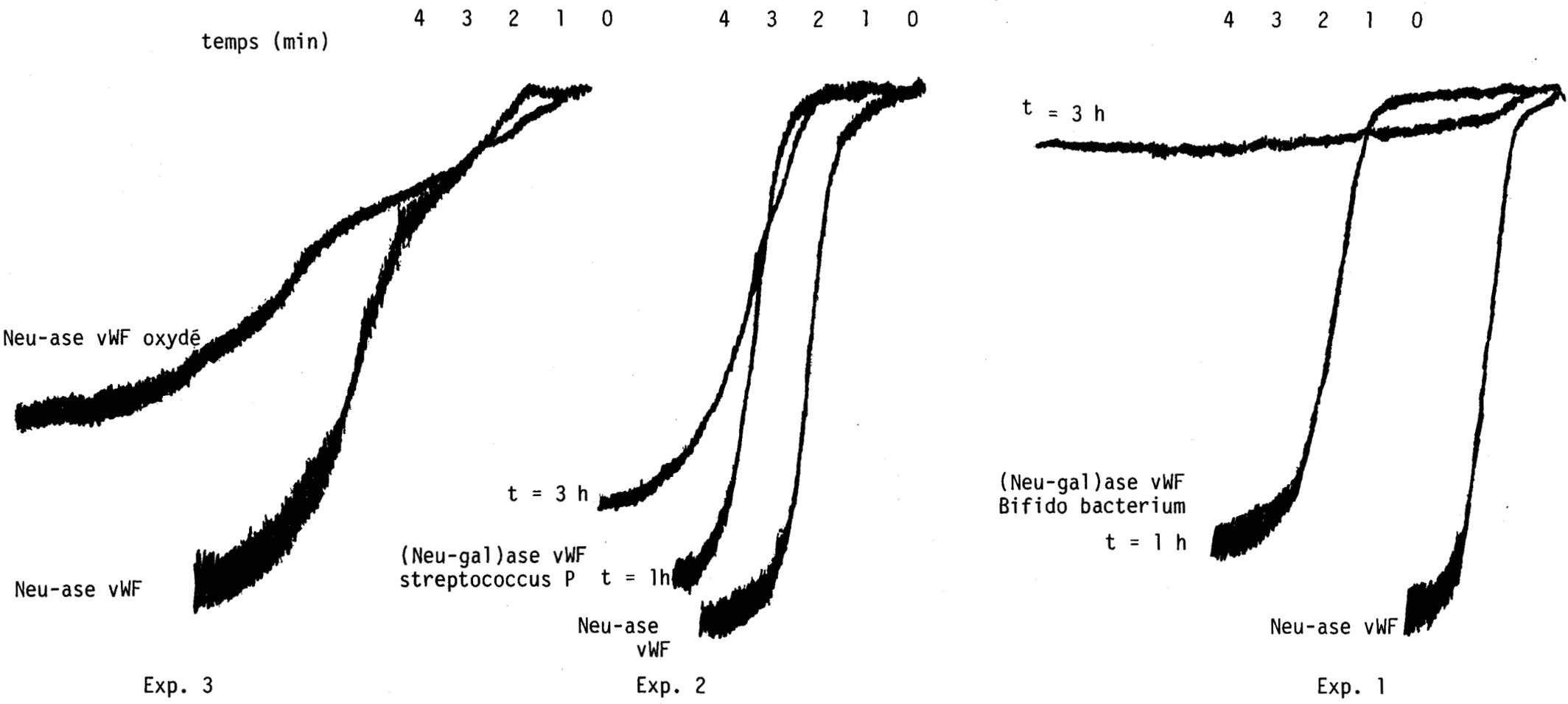


Figure 14 : COURBES D'AGREGATION PLAQUETTAIRE INDUITE PAR DIFFERENTES PREPARATIONS DE vWF MODIFIE.
 10 microgrammes de chaque préparation sont ajoutés à 0.35 ml de plasma riche en plaquettes.

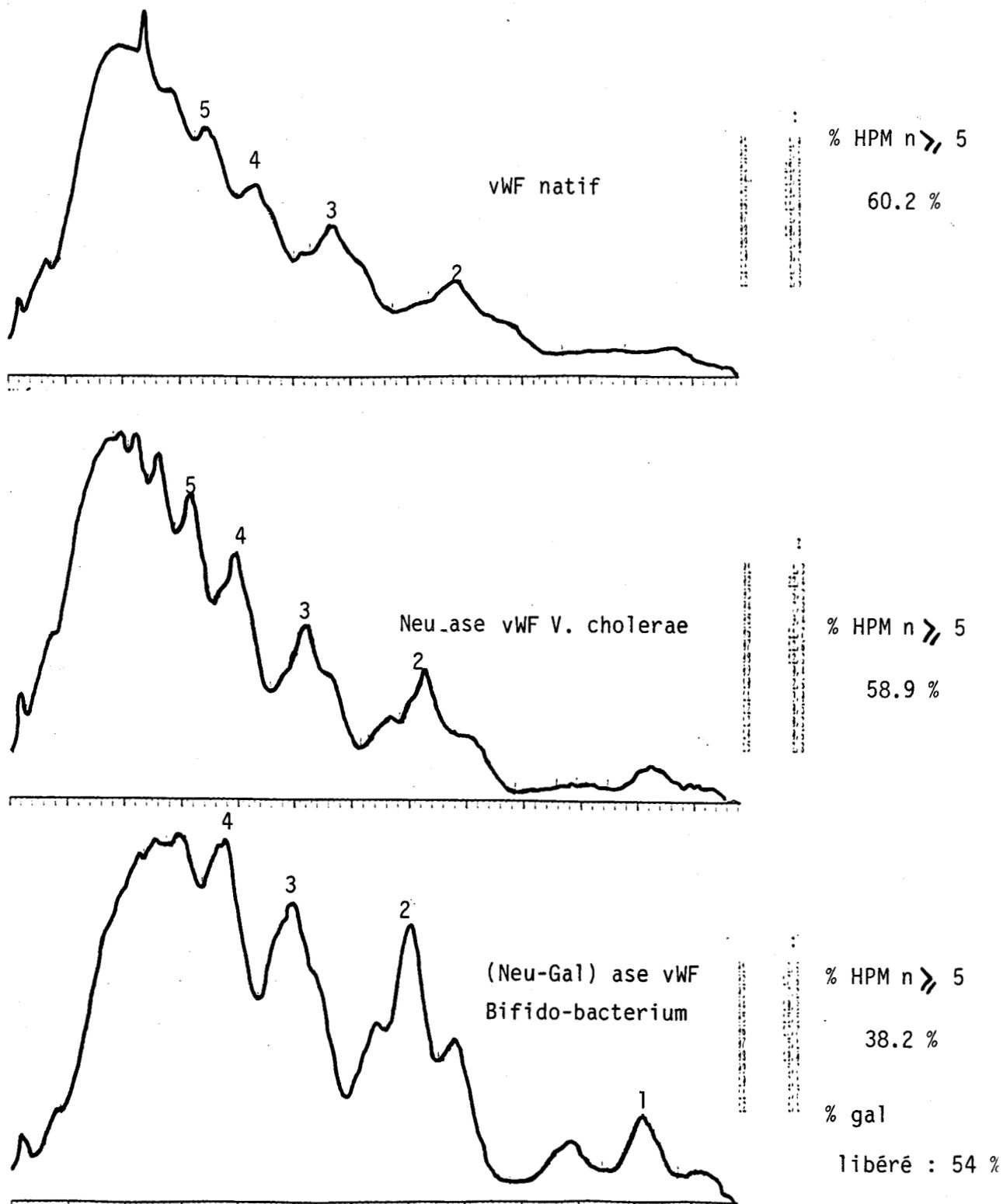
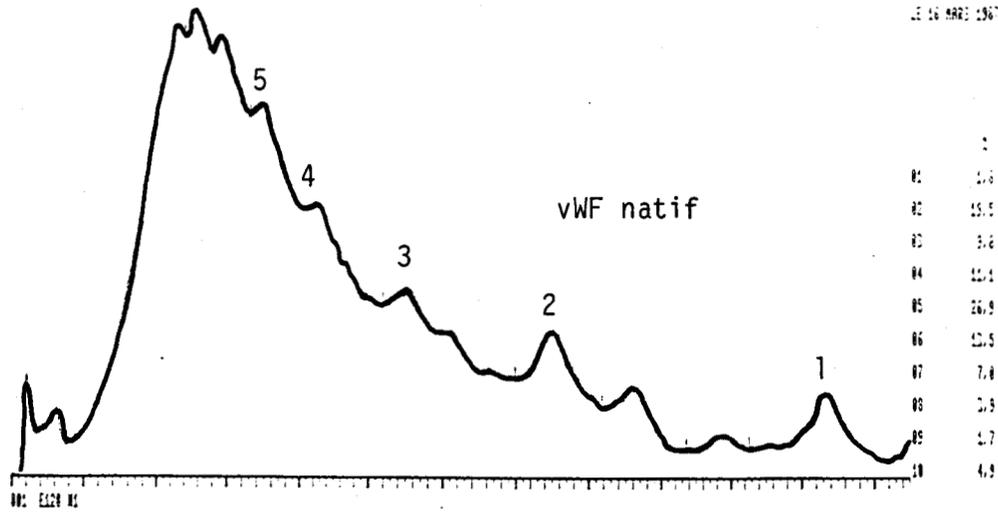
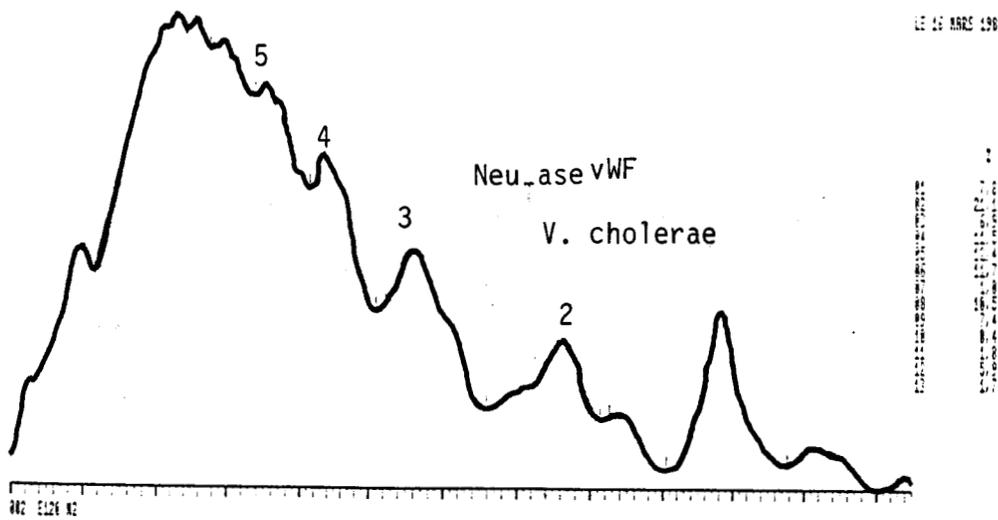


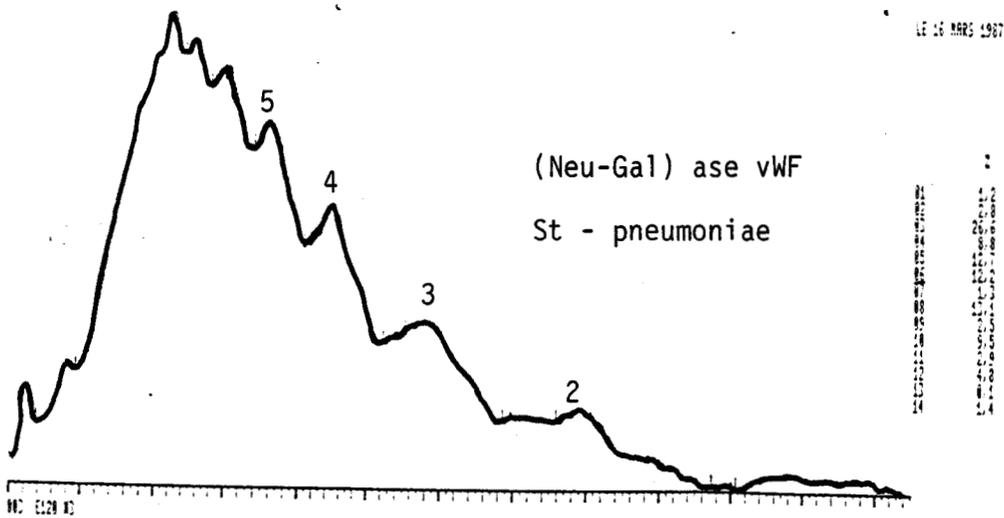
Figure 15 : ENREGISTREMENT DENSITOMETRIQUE DES MULTIMERES DU vWF ANALYSES EN ELECTROPHORESE 2.5 % D'AGAROSE EN PRESENCE DE SDS.



% HPM n \geq 5
65.5 %



% HPM n \geq 5
59.7 %



% HPM n \geq 5
64.3 %

% gal
libéré : 46 %

Figure 16 : ENREGISTREMENT DENSITOMETRIQUE DES MULTIMERES DU vWF ANALYSES EN ELECTROPHORESE 2.5 % D'AGAROSE EN PRESENCE DE SDS.

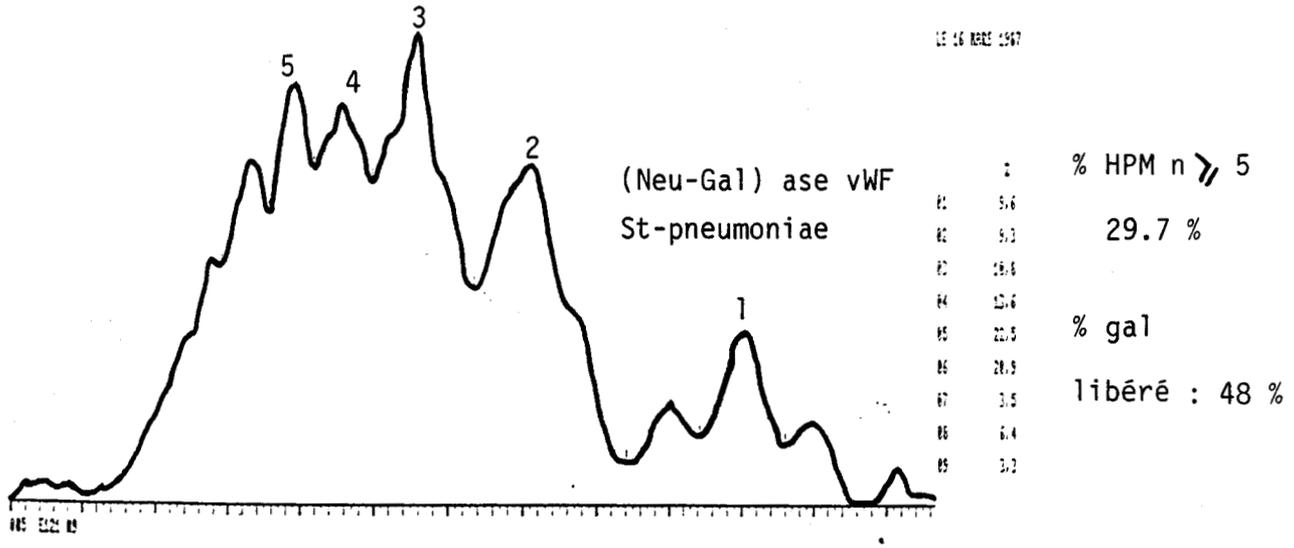
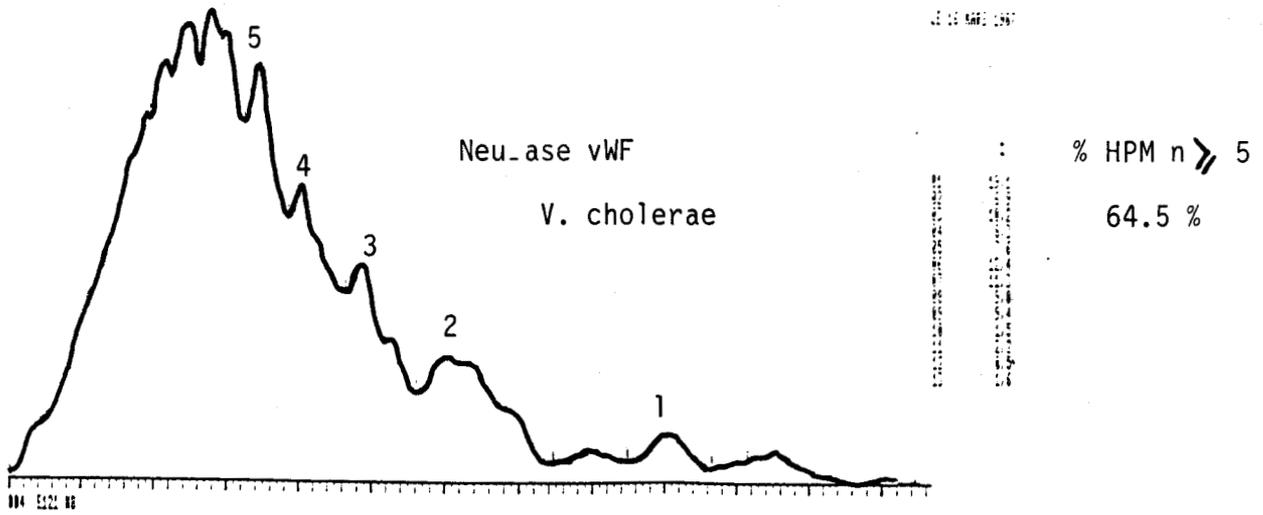


Figure 17 : ENREGISTREMENT DENSITOMETRIQUE DES MULTIMERES DU VWF
ANALYSES EN ELECTROPHORESE 2.5 % D'AGAROSE EN PRESENCE
DE SDS.

poursuivi en utilisant la galactose oxydase de *Dactylium dendroides*. En effet, cette enzyme est intéressante puisqu'il est théoriquement possible de réduire ultérieurement les résidus de galactose qui ont été oxydés, et ainsi, d'étudier la réversibilité de la modification du galactose. Des travaux au laboratoire sur cette enzyme ont montré qu'il était possible d'oxyder 27 % du galactose du vWF natif et 75 % à partir du (Neu-ase) vWF (résultats obtenus par dosage du galactose oxydé en chromatographie de phase gazeuse). La réduction avec 10 mM de BH_4K ne réduit que 75 % du galactose oxydé. Pour cette raison, nous avons voulu augmenter la concentration de BH_4K (100 mM) ce qui a provoqué une dénaturation du vWF visualisé par la perte de la structure multimérique en électrophorèse. Il nous faudra donc réétudier les conditions de réduction du galactose oxydé pour tirer le maximum de renseignements de l'utilisation de la galactose oxydase.

Cependant, ces expériences nous ont tout de même montré que l'oxydation du galactose du vWF natif n'induit qu'une très faible diminution de l'adhésion plaquettaire au collagène alors que le cofacteur de la ristocétine est diminué de 61 % (Tableau III).

De même, nous avons étudié l'influence de la galactose oxydase sur l'AS-vWF (Tableau III).

L'adhésion plaquettaire est diminuée vis-à-vis de celle obtenue avec (Neu-ase) vWF (perte de 28 % environ) et reste légèrement supérieure au témoin vWF natif. L'analyse multimérique de cet AS-vWF oxydé (Fig.18) met en évidence une perte des HPM du vWF (53.6 % de HPM pour (Neu-ase) vWF contre 28.1 % de HPM pour (Neu-ase) vWF oxydé) semblable à celle obtenue en présence de la galactosidase de *Bifidobacterium*. Cependant, lors des quelques expériences que nous avons faites, nous n'avons pas eu assez de (Neu-ase) vWF oxydé pour étudier l'adhésion plaquettaire et le cofacteur de la ristocétine.

Nous observons également que le pourcentage d'agrégation induit par (Neu-ase)vWF oxydé (65 %) est diminué vis-à-vis du (Neu-ase) vWF (100 %) (Fig. 14). Cependant les temps de latence apparaissent peu différents.

	Témo in	vWF		(Neu-ase)vWF	
		normal	oxydé	normal	oxydé
% Adhésion plaquettaire *	100	N=2 65 ± 13	N=2 56 ± 1	n=6 156 ± 22	n=6 113 ± 7.7
Cofacteur U/mg	nd	N=2 36 ± 8	N=2 13 ± 3	nd	nd

Tableau III : Adhésion des plaquettes au collagène I III non fibrillaire, et cofacteur de la ristocétine induit par le vWF et le (Neu-ase)vWF, normaux ou oxydés par une galactose oxydase (*Dactylium dendroides*)

$\gamma = 1\ 300\ \text{sec}^{-1}$ tps = 3 min

N : nombre d'expériences différentes

n : nombre d'échantillons testés

* : page 53

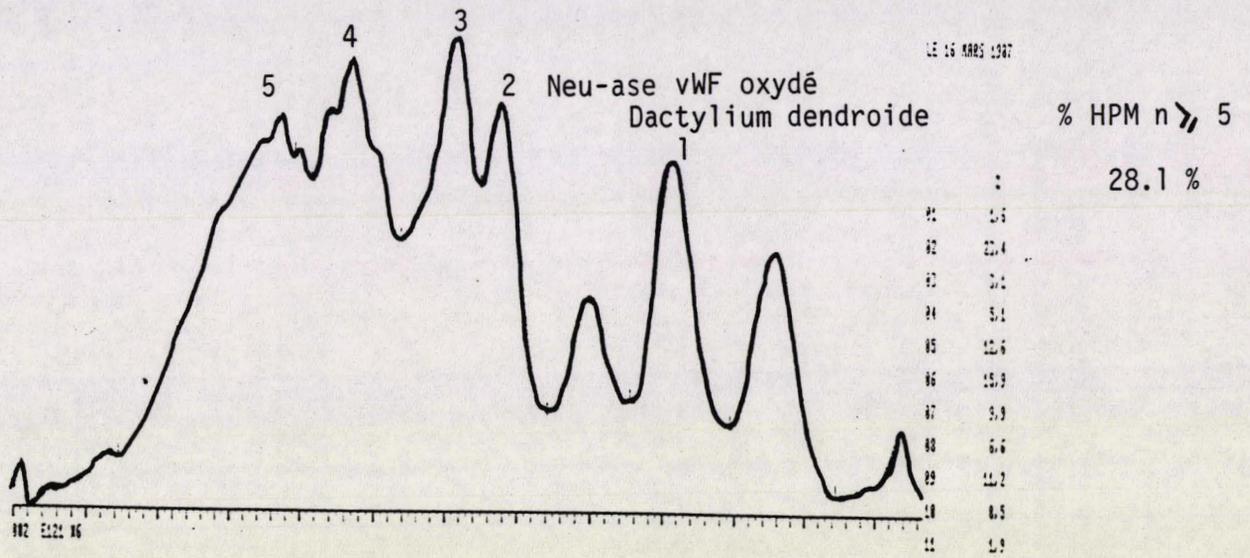
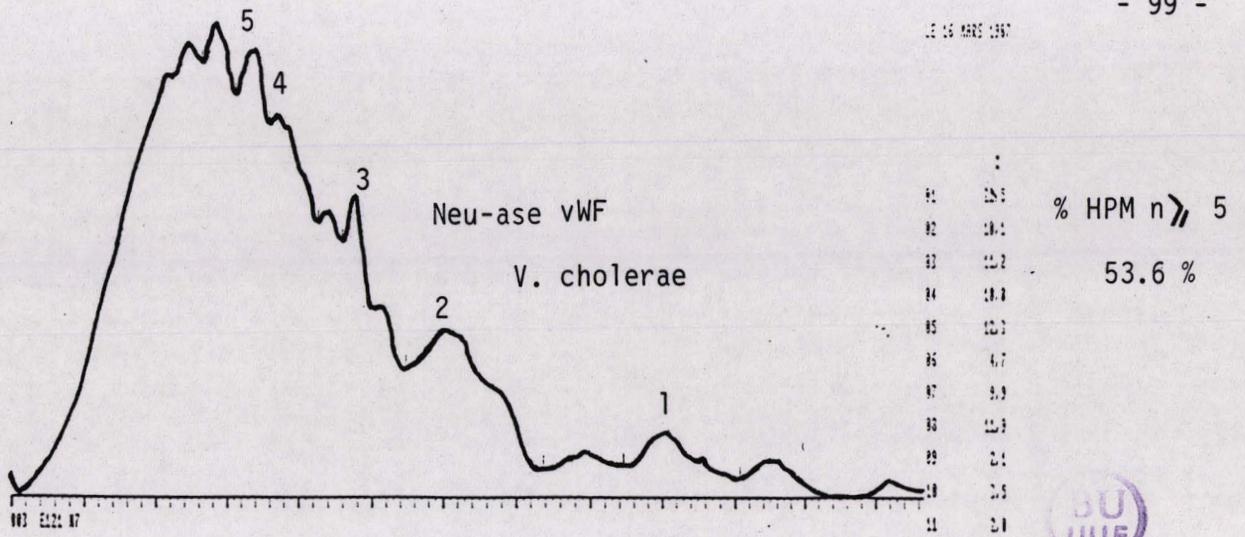


Figure 18 : ENREGISTREMENT DENSITOMETRIQUE DES MULTIMERES DU vWF ANALYSES EN ELECTROPHORESE 2.5 % D'AGAROSE EN PRESENCE DE SDS.

DISCUSSION

Vu la diminution de réactivité du (Neu-Gal)-ase vWF observée vis-à-vis de la plaquette en présence de ristocétine, on pouvait s'attendre à une diminution de l'adhésion plaquettaire avec le (Neu-Gal)-ase vWF, puisque d'autres équipes ont montré que ces propriétés étaient toutes deux inhibées par des anticorps monoclonaux inhibiteurs de l'agrégation des plaquettes en présence de ristocétine.

Ainsi, après avoir montré par de nombreuses expériences que l'adhésion plaquettaire était augmentée avec le (Neu-Gal)-ase vWF, il semblait indispensable de vérifier avec les préparations mêmes qui induisent une augmentation de l'adhésion plaquettaire, que la fixation aux plaquettes en présence de ristocétine était diminuée.

Nous avons donc radiomarcqué ces préparations de vWF natif et modifié par des exoglycosidases, puis nous avons simultanément étudié - la fixation de ces préparations aux plaquettes en présence de ristocétine et de thrombine, - l'adhésion des plaquettes au collagène, - la fixation du vWF au collagène dans le système de perfusion, ainsi que - le cofacteur de la ristocétine.

Par cette expérience, nous avons confirmé que la même préparation de (Neu-Gal)-ase vWF induisait bien une augmentation de l'adhésion plaquettaire mais perdait ses capacité de fixation aux plaquettes en présence de ristocétine. Cependant, cette diminution de l'ordre de 50 % est inférieure à celle trouvée lors de travaux antérieurs. D'autre part, le cofacteur de la ristocétine apparaît lui aussi fortement diminué. Aussi, il apparaît qu'avec deux systèmes d'études faisant apparemment intervenir les mêmes domaines du vWF, on puisse obtenir des résultats contradictoires, et on peut se demander quelles seraient les conséquences de ces modifications enzymatiques "in vivo".

L'explication de ces résultats réside certainement dans le fait que, même si l'adhésion plaquettaire et la fixation du vWF en présence de ristocétine font intervenir le même site fonctionnel, cette interaction ne se fait pas dans les mêmes conditions. En effet, la fixation du vWF aux plaquettes en présence de ristocétine se fait certainement par un effet de charge qui est plus ou moins important suivant la conformation de la molécule ; par contre, l'adhésion plaquettaire est un phénomène plus complexe qui fait intervenir le site de fixation du vWF aux constituants du

sous-endothélium ainsi qu'à la GpIb, mais aussi au complexe GpIb IIIa plaquettaire.

Il fallait aussi vérifier que cette augmentation de l'adhésion plaquettaire n'était pas due à une forte augmentation de la première étape de fixation du vWF au collagène. Pour cela, nous avons également montré que la quantité de (Neu-Gal)ase vWF fixée sur le collagène n'était pas augmentée par rapport au vWF natif. L'augmentation de l'adhésion plaquettaire semble donc être due à une plus forte interaction plaquette-plaquette, sous la dépendance du vWF et du GpIb/IIIa plaquettaire. Cette hypothèse serait en corrélation avec l'augmentation de la fixation du (Neu-Gal)-ase vWF aux plaquettes en présence de thrombine, bien que cette augmentation n'aie pas été trouvée dans nos expériences antérieures.

De cette expérience, nous pouvons également conclure que le cofacteur de la ristocétine et la fixation du vWF aux plaquettes en présence de ristocétine ne sont pas en corrélation avec l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium.

D'autres expériences utilisant la β -galactosidase de *Bifido bacterium* ont permis de confirmer l'augmentation de l'adhésion plaquettaire avec le (Neu-Gal)-ase vWF.

Cette adhésion est augmentée vis-à-vis du vWF natif mais diminuée vis-à-vis du Neu ase vWF. Il y a donc quelques différences entre les produits obtenus par l'enzyme de *Bifido bacterium* et ceux obtenus par l'enzyme de *Streptococcus Pneumoniae*. Cette différence n'est pas due au taux de galactose libéré puisque ces deux enzymes libèrent des taux de galactose voisins. Malheureusement, les dosages des sucres résiduels en chromatographie de phase gazeuse (CPG) faits sur ces préparations, n'ont pas abouti à des résultats interprétables puisque nous avons trouvé une diminution de certains sucres comme la galactosamine et la glucosamine qui ne sont pas sensibles aux enzymes utilisés. Bien qu'une contamination de la β -galactosidase par d'autres enzymes ne puisse être écartée, nous pensons néanmoins que ces résultats sont dus à des erreurs de dosage puisque, dans certains cas, nous avons retrouvé cette forte diminution des galactosamines et des glucosamines sur le vWF natif et sur le (Neu-ase) vWF, ceci pouvant s'expliquer par une mauvaise N-réacétylation lors du dosage en CPG. De plus, des expériences faites en présence ou non d'inhibiteurs (2 acetamido 2 deoxy-D-galactonolactone) de la galactosaminidase et de la glucosaminidase ont donnés des résultats identiques.

L'étude parallèle des multimères de ces préparations montre que la perte relative des HPM du (Neu-Gal)-ase vWF (37 % par rapport au vWF natif

n'induit pas une diminution de l'adhésion plaquettaire vis à vis du vWF natif. On peut donc dire que l'adhésion plaquettaire ne dépend pas uniquement de la présence des HPM du vWF. Ces résultats sont en accord avec certains travaux montrant que l'adhésion plaquettaire est indépendante de la structure multimérique du vWF (Sixma et al., 1984a).

D'autre part, les résultats obtenus avec la galactose oxydase sur le vWF natif montrent que l'oxydation du galactose ne modifie pas les capacités du vWF à induire l'adhésion plaquettaire. Aussi, nous confirmons que l'activité cofacteur du vWF n'est pas corrélée avec sa capacité à induire l'adhésion des plaquettes au collagène.

De même, le (Neu-ase) vWF oxydé induit une adhésion plaquettaire qui est intermédiaire entre le vWF natif et le (Neu-ase) vWF montrant que l'oxydation du galactose n'affecte pas la capacité du vWF à induire l'adhésion plaquettaire. L'étude des multimères du (Neu-ase) vWF oxydé montre une diminution des HPM du vWF (perte de 54 % par rapport (Neu-ase) vWF) (Fig.18) et une agrégation du PRP diminuée.

Nous voyons ainsi que l'effet d'une galactose oxydase (Fig.18) comme, dans certains cas, l'effet d'une β -galactosidase (Fig.17) peut induire une diminution des HPM du vWF sans diminuer la capacité du vWF à induire l'adhésion. Ces expériences avec la galactose oxydase confirment donc en partie les résultats des expériences obtenue avec les galactosidases. Il aurait été, cependant, intéressant de pouvoir quantifier à chaque expérience le taux de galactose oxydé de façon à corréliser directement ces résultats avec ceux du galactose hydrolysé.

L'ensemble de ces expériences complémentaires confirment que l'hydrolyse de 40 à 45 % du galactose du vWF ne perturbe pas les propriétés du vWF dans l'adhésion plaquettaire bien qu'elle induise un changement de la structure multimérique du vWF. Ces résultats sont à rapprocher avec des résultats de l'hydrolyse du galactose du vWF par la β -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae* qui montrent que pour un taux voisin de galactose libéré, il y a soit maintien, soit diminution des HPM du vWF, ce qui tend à montrer que cette perte de HPM n'est qu'une conséquence indirecte de l'hydrolyse du galactose.

D'autre part, Federici et al. (1984) ont montré que l'action de l'endo-F ne perturbait pas la structure multimérique du vWF alors que la presque totalité de la structure des N-glycannes est hydrolysée. Cependant des expériences similaires faites au laboratoire ont montré que l'action de

l'endo-F sur le vWF le rendait insoluble, ce qui peut se comprendre vu les propriétés hydrophiles des glycanes.

Nos résultats sont apparemment en contradiction avec ceux de Lawrence et Galnick (1987) qui ont récemment montré que le Neu ase vWF et le (Neu-gal)ase vWF induisaient une diminution de l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium en inhibant la fixation du vWF sur la plaquette. Cette expérience n'est tout de même pas comparable à la nôtre puisque l'adhésion plaquettaire est étudiée au sous-endothélium, à des vitesses de cisaillement (2600 sec^{-1}) et pendant des temps (5 minutes) supérieurs aux nôtres et de plus, les préparations modifiées sont ajoutées à du plasma normal et non à du plasma sans vWF.

Aussi, il est possible que l'augmentation de l'adhésion plaquettaire que nous observons soit due à une fixation rapide de ces préparations au collagène, ainsi qu'à une forte croissance des thrombi plaquettaire mise en évidence par des temps de perfusion courts (3 minutes). Pour des temps plus longs et sous certaines conditions de flux, il se peut qu'une partie des gros agrégats formés se décrochent du sous-endothélium et induisent une apparente diminution de l'adhésion plaquettaire. Il serait donc nécessaire d'étudier la fixation des plaquettes au cours du temps et également de faire une étude morphométrique des plaquettes fixées.

Actuellement, nos expériences ne nous permettent pas de conclure sur le rôle biologique exact du galactose. Il semble cependant qu'il soit, au moins indirectement, impliqué dans la multimérisation du vWF et également dans le maintien du cofacteur de la ristocétine. Le galactose pourrait par exemple avoir un rôle de protection du vWF comme l'ont montré certains auteurs (Federici et Berkowitz, 1987). Par contre, l'ensemble de nos résultats sont en accord pour dire que le galactose et l'acide sialique ne sont pas indispensables aux propriétés du vWF dans l'adhésion des plaquettes au collagène, dans le système de perfusion.

II - EFFET INHIBITEUR DE DIFFERENTS ANTICORPS MONOCLONAUX, DIRIGES CONTRE LE vWF, SUR L'ADHESION PLAQUETTAIRE

Sur l'ensemble des anticorps monoclonaux dirigés contre le vWF, décrits dans la littérature, 4 anticorps inhibent à au moins 80 % l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium (Goodall et Meyer, 1985), ce qui montre qu'il existe des sites bien spécifiques responsables du mécanisme d'adhésion. On comprend alors qu'une étude approfondie de ces anticorps

monoclonaux permettent une meilleure compréhension du rôle du vWF dans l'adhésion plaquettaire.

Nous avons, dans un premier temps, caractérisé un anticorps monoclonal dirigé contre le vWF provenant de l'équipe de J.P. Allain (C.N.T.S. Paris). Nous avons trouvé cet anticorps inhibiteur de l'adhésion plaquettaire au collagène et au sous-endothélium. Les différents travaux portant sur cet anticorps ont été publiés par *Thrombosis and Haemostasis*.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons recherché systématiquement parmi les anticorps produits au laboratoire des anticorps monoclonaux (H. Broly) du C.R.T.S. de Lille, ceux qui étaient inhibiteurs de l'adhésion plaquettaire. Deux anticorps se sont révélés être inhibiteurs de l'adhésion des plaquettes au collagène.

A. PUBLICATION (cft. p. 105 à 109)

L'étude de l'anticorps 211 A6 obtenu par J.P. Allain et H. Lee (C.N.T.S., Paris) après une immunisation avec du FVIII purifié a montré qu'il est en fait spécifique du vWF contaminant encore la préparation immunisante. Les investigations ultérieures ont montré, en outre, que cet anticorps était inhibiteur :

- de la fixation du vWF aux plaquettes en présence de ristocétine
- de l'agglutination des plaquettes en présence de ristocétine
- de l'adhésion des plaquettes au collagène et au sous-endothélium

L'effet inhibiteur de l'adhésion des plaquettes a été étudié à des vitesses de cisaillement relativement élevées (800 et 1 300 sec^{-1}) puisqu'il est dit dans la littérature que le vWF intervient dans l'adhésion plaquettaire essentiellement à haute vitesse de cisaillement. Par contre cet anticorps n'a pas été trouvé inhibiteur de la fixation du vWF aux fibres de collagène.

B. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Des travaux complémentaires à cette étude nous ont semblé nécessaires. En effet, au vu du fort effet inhibiteur de cet anticorps sur l'adhésion plaquettaire à haute vitesse de cisaillement, il nous a paru

Characterisation of a Monoclonal Antibody to von Willebrand Factor as a Potent Inhibitor of Ristocetin-Mediated Platelet Interaction and Platelet Adhesion

Sylvie Jorieux, Christophe de Romeuf, Bruno Samor, Maurice Goudemand, and Claudine Mazurier

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

Key words

Monoclonal antibody - von Willebrand factor - Ristocetin factor - Platelet adhesion

Summary

We studied a murine monoclonal antibody (211 A6) to von Willebrand factor (vWF) with a view to investigating structure-relationship of plasma vWF. The specificity of this antibody has been substantiated by ELISA tests and indirect immunofluorescence. It reacts with purified vWF, normal plasma but not with plasma or platelets from a severe von Willebrand's disease patient. Monoclonal antibody 211 A6 is a potent inhibitor of ristocetin-induced platelet aggregation. The ^{125}I -FVIII/vWF binding to platelets in presence of ristocetin is totally inhibited by low 211 A6 concentrations. Thrombin-induced binding of vWF to platelets is not affected by 211 A6. The ability of this antibody to inhibit platelet adhesion to subendothelium and to collagen was investigated with a perfusion model. The complete inhibition of platelet adhesion by 211 A6 questions the similarity or the relationship in vWF domains involved in ristocetin-induced platelet functions and platelet adhesion.

Introduction

Human von Willebrand factor (vWF) is a large glycoprotein that circulates in plasma as a complex (FVIII/vWF) with procoagulant factor VIII. vWF is synthesised by vascular endothelial cells (1) and megakaryocytes and is found in blood platelets (2, 3). vWF is composed of a series of disulfide-linked subunits or multimers with estimated molecular weights from 1 to 12×10^6 daltons (4, 5, 6). Amino acid sequence analysis (7, 8) and cDNA cloning (9, 10) have indicated that the vWF subunit is a single polypeptidic chain of about 270 kDa.

vWF is a polyfunctional molecule essential for the formation of thrombotic plug. It is required for platelet adhesion to subendothelium and to collagen at high wall shear rates (11, 12). Biological activity of vWF is measured *in vitro* by its ability to promote platelet aggregation or to bind on platelet membrane glycoprotein Ib (GPIb) in the presence of ristocetin (13). Thrombin, adenosine diphosphate and collagen also induce vWF binding to platelet membrane glycoprotein complex IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) but to a lesser extent (14, 15, 16).

At the present time several workers have described and produced murine monoclonal antibodies (MAB) directed against human vWF (17). They are used as reagents for the assay of vWF (8, 19) or as tools for the studies of the functional properties of

vWF. MAB against vWF have been described which inhibit platelet adhesion to glass beads (18, 19) or subendothelium (20-22), vWF binding to platelets (20, 22-24) or collagen (20) and ristocetin cofactor activity (18-22, 25). Due to their unique specificity, the use of monoclonal antibodies provides information to correlate the various vWF functions with specific molecular substructures.

We describe here the characterisation of a murine MAB to vWF which completely inhibits the ristocetin-induced platelet aggregation as well as the ability of vWF to support platelet adhesion to subendothelium and collagen.

Materials and Methods

Material

A. Monoclonal Antibodies

In this study we used a murine monoclonal antibody against vWF coded 211 A6. Immunisation and fusion methods were described previously by Croissant et al. (26). An unrelated MAB against α -human chorionic gonadotropin (α -hCG) used as control was a generous gift of Immunotech, Marseilles, France.

Cellulose acetate electrophoresis was performed on ascitic fluids and IgG level was estimated on the basis of corresponding scan and protein assay.

MAB was purified from ascites fluid by affinity chromatography with protein A - Sepharose CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) according to Ey et al. (27). These preparations were shown to contain 95% homogeneous IgG by gradient polyacrylamide gel electrophoresis.

Protein concentration was estimated by Lowry assay.

B. Isolation of FVIII/vWF

Human FVIII/vWF was purified from therapeutic cryoprecipitates (Centre Régional de Transfusion Sanguine, Lille, France) as described by Mazurier et al. (28) with some minor modifications. The cryoprecipitates from which most of fibrinogen was removed by precipitation with glycine 12% (w/v), were applied to Sepharose CL-4B column (75×2.6 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl, 0.02 M ϵ -aminocaproic acid, 0.05 M acetate buffer, pH 7.0. The void volume fractions were pooled and precipitated by dialysis against 1.6 M ammonium sulphate pH 7.0. at 4° C for 18 h.

Methods

A. Characterisation of Monoclonal Antibody

1. ELISA Tests

a) For determining monoclonal antibody specificity, wells in microplates (Nunc Immunoplates I, Denmark) were coated with 100 μ l of ascitic fluids diluted 1000 fold in 0.1 M bicarbonate buffer, pH 9.6 and incubated overnight at 4° C. After washing 3 times with 0.15 M NaCl, 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 containing 0.05% Tween 20, 100 μ l of

Correspondence to: Dr. S. Jorieux, Centre Régional de Transfusion Sanguine, 21 rue Camille Guérin, 59012 Lille Cédex, France

serial dilutions of normal plasma, plasma from a severe haemophilia A patient or plasma from a patient with severe von Willebrand's disease (vWD) (in PBS containing 6% bovine serum albumin) were incubated overnight at 4° C. The plates were washed as described above and 100 µl of affinity-purified peroxidase-labelled IgG of a rabbit antiserum against human vWF (28) diluted in PBS-BSA 3% were added to each well and incubated for 1 h at 37° C. After washing, 100 µl of O-phenylene diamine dihydrochloride (0.4 mg/ml in 0.02 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0) were added and reaction was stopped after 3 min with 100 µl 1 M H₂SO₄. The plates were read photometrically at 490 nm.

Confirmation of the specificity to vWF was determined by coating microplates either with purified human FVIII/vWF or control proteins (purified human fibronectin, fibrinogen, IgG and albumin).

b) Antibody titre was determined by an ELISA test using microplates coated with 100 µl of purified FVIII/vWF diluted at 10 µg/ml in 0.02 M sodium phosphate buffer pH 7.2. Serial dilutions of ascitic fluids (in PBS-BSA 3%) were added and incubated for 1 h at 37° C or overnight at 4° C. After washing as described above, bound monoclonal antibodies were detected by adding 100 µl peroxidase labelled sheep anti-mouse immunoglobulin (Institut Pasteur, Paris, France) diluted 1:5000 in PBS-BSA 3% and incubated 1 h at 37° C. After washing, the same procedure as described above was used. The titre was expressed as the highest dilution sample giving a positive reaction, i.e., 2 fold the value obtained with the control ascitic fluid.

2. Indirect Immunofluorescence

Ascitic fluids diluted 1:1000 were used as specific antibodies in an indirect immunofluorescence stain of human buffy coat preparations according to Katzmann et al. (29).

B. Inhibiting Activity of Monoclonal Antibody

Inhibition of factor VIII coagulant activity was assessed using a one-stage assay (30).

Platelet Aggregation

Inhibition of platelet aggregation induced by ristocetin (1.2 mg/ml final), thrombin (0.25 U/ml final), ADP (2.4 µM/ml final) or human fibrillar collagen (75 µg/ml final) was determined in platelet rich plasma (PRP). Aggregation was initiated by adding 100 µl of agonist to 300 µl of PRP pre-incubated at 37° C for 10 min in an aggregation cuvette with 20 µl of ascitic fluids dilutions. Aggregation was carried out at 37° C at 1000 rpm for 5 min.

Binding of FVIII/vWF to Collagen

Preparation of fibrillar collagen types I and III isolated from human umbilical arteries by pepsin digestion was performed as previously described by Sixma et al. (31).

Measurement of the inhibition of FVIII/vWF binding to collagen by MAbs was performed according to Sixma et al. (31) with minor modifications. Two hundred and fifty µl of platelet-poor plasma from a pool of 20 donors were first incubated with 6 µl of ascitic fluid or 6 µl of 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, for 1 h at 37° C. Fifty µl of various concentrations of collagen fibrils were then added to the mixture. After 15 min. incubation at 37° C under occasional stirring, the mixture was centrifuged 5 min at 12000 g using a microcentrifuge (Eppendorf). The supernatants were pipetted off and residual vWF:Ag was estimated in supernatants by ELISA assay as previously described (32).

Binding of ¹²⁵I-FVIII/vWF to Platelets

Platelets were washed as described previously by Patscheke (33) and used at a concentration of 8 × 10⁵/µl. In a first step, 0.65 µg of FVIII/vWF radiolabelled with ¹²⁵Iodine as previously described (34) was mixed in equal volumes of either various dilutions of purified monoclonal antibody or buffer and incubated for 30 min. at 37° C. In a second step, ¹²⁵I-FVIII/vWF binding assay was performed as described by Goudemand et al. (34).

Platelet Adhesion

In order to study blood platelet adhesion to subendothelium, perfusions were carried out at 37° C under steady flow (35) in an annular

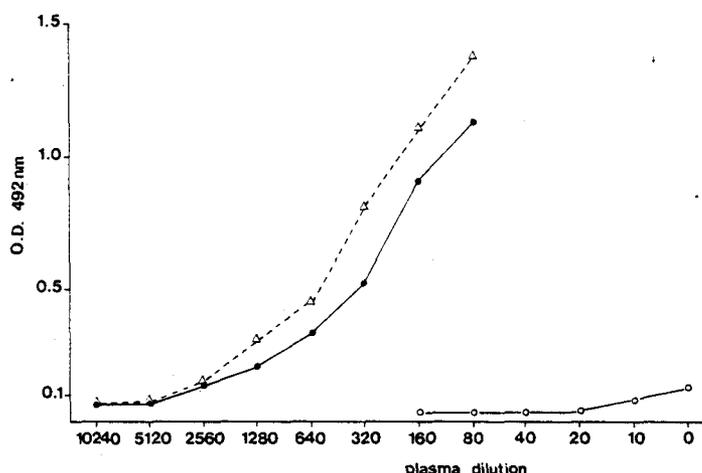


Fig. 1 Specificity ELISA test for ascitic fluid 211 A6. ● - Normal plasma, △ - haemophilia A plasma, ○ - severe vWD plasma

perfusion chamber according to Baumgartner (36). Subendothelium was obtained from human umbilical arteries and exposed to perfusates made up from washed ¹¹¹In-labelled platelets (37), 40% red cells and normal plasma from blood anticoagulated with 1:10 vol. 110 mM trisodium citrate. Before perfusion, reconstituted blood (16 ml) was incubated for 20 min at 37° C with 10 µl/ml of various dilutions of ascitic fluids. In some cases reconstituted blood was made with vWF-deficient plasma (vWF antigen <0.01 U/ml) obtained by immunodepletion (38).

Inhibition of platelet adhesion to collagen was studied with the rectangular perfusion chamber system described by Sakariassen et al. (39). Glass coverslips were sprayed with bovine collagen types I and III (Pancogene 174, Saduc, Chaponost, France) or the human collagen described above which was applied in soluble form in 50 mM acetic acid. Collagen concentration was 30 µg/cm², and perfusions were performed for 5 min at a wall shear rate of 1000 sec⁻¹. For inhibition studies, 160 µl of varying dilutions of ascitic fluids were incubated for 20 min at 37° C with 9 ml normal plasma (10 µl ascite/ml reconstituted blood).

The number of deposited platelets per cm² of subendothelium or glass coverslips was determined after 5 min perfusion runs.

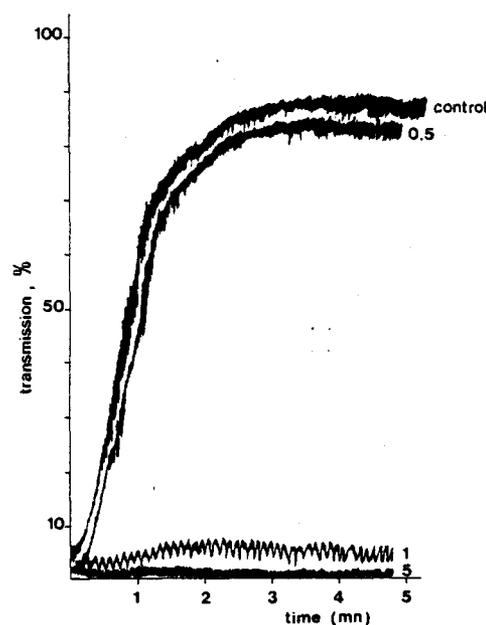


Fig. 2 Inhibition of ristocetin-induced platelet aggregation by ascitic fluid 211 A6. Ascitic fluid 211 A6 is diluted in phosphate saline buffer to obtain 0.5, 1, 5 µg IgG/ml final. Control ascite anti-α-hCG is used at the same concentrations

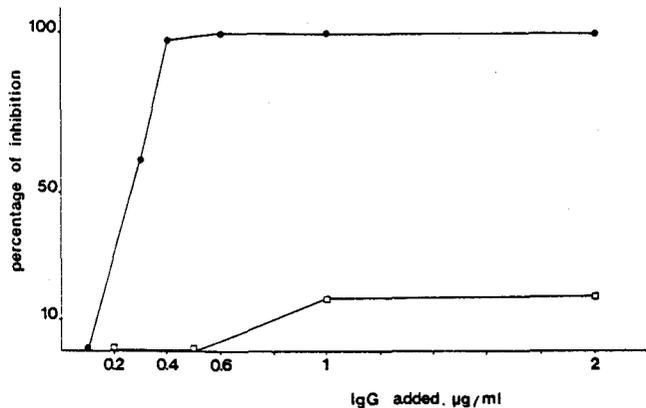


Fig. 3 Effect of anti-vWF monoclonal antibody 211 A6 on the ristocetin (—●—) and thrombin (—□—) induced binding of FVIII/vWF to platelets, each point represents the mean of 3 experiments

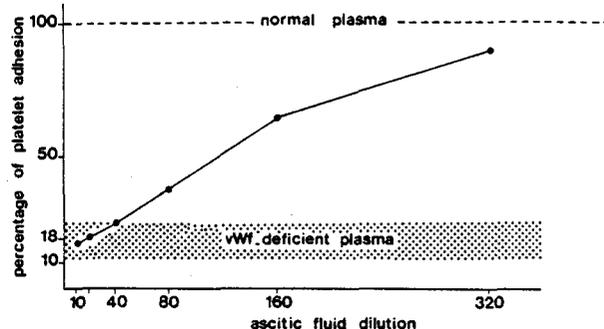


Fig. 5 Inhibition of platelet adhesion to soluble bovine collagen by anti-vWF monoclonal antibody 211 A6. The values are the means of 13 experiments with normal plasma and 9 experiments in the presence of ascitic fluid dilutions (see the text)

Results

Characterisation

MAb 211 A6 is of IgG 1 subclass as determined by double diffusion analysis and protein A-Sephrose chromatography. It reacts with normal plasma, plasma from a severe haemophilia A patient but not with plasma from a patient with severe vWD (Fig. 1). Its specificity for vWF was confirmed by its lack of reaction with human fibrinogen, fibronectin, IgG and albumin. Furthermore, indirect immunofluorescence on blood smears gave a characteristic granular fluorescence of normal platelets, whereas this staining did not occur on platelets from a severe vWD patient.

The antibody titre of a pool of ascitic fluids with 12.3 mg/ml IgG was 10^7 .

MAb 211 A6 (6 mg IgG/ml) does not inhibit plasma FVIII procoagulant activity. Immunodiffusion studies showed that 211 A6 does not precipitate with purified or plasma vWF.

Effect on Platelet Aggregation

Incubation of ascitic fluid 211 A6 with normal PRP produced a dose-dependent inhibition of ristocetin-induced platelet aggregation (Fig. 2). Ristocetin-induced platelet aggregation was almost completely inhibited by 1 µg IgG/ml PRP. On the other hand, aggregations induced by either thrombin, ADP or collagen were not at all affected by 211 A6, even at high concentrations (data

not shown). Control ascitic fluid used at the same IgG concentration did not act on platelet aggregation.

Effect on FVIII/vWF Binding to Platelets

The effect of 211 A6 on FVIII/vWF binding to platelets was tested by using both ascitic fluid (data not shown) or purified IgG. The same results are obtained with similar concentrations of MAb.

In the absence of anti-vWF antibody, ristocetin mediated binding of 350 ng vWF (100%) to 8×10^7 platelets. Inhibition of ristocetin-mediated binding of 125 I-FVIII/vWF to washed platelets by purified MAb 211 A6 was dose-dependent (Fig. 3). The addition of 250 ng IgG (0.5 µg/ml final) induced a complete inhibition of FVIII/vWF binding to platelets. Thrombin-induced binding of 200 ng vWF (100%) to 8×10^7 platelets was not affected by even 250 ng IgG 211 A6. As shown in Fig. 3, addition of 1 µg IgG/ml final inhibited by only 17% the thrombin-induced binding of 125 I-FVIII/vWF observed in the absence of any monoclonal antibody.

Effect on vWF Binding to Collagen

The effect of 211 A6 on plasma vWF binding to collagen was studied using various concentrations (0 to 300 µg/ml plasma) of human fibrillar collagen type III. The increase in collagen

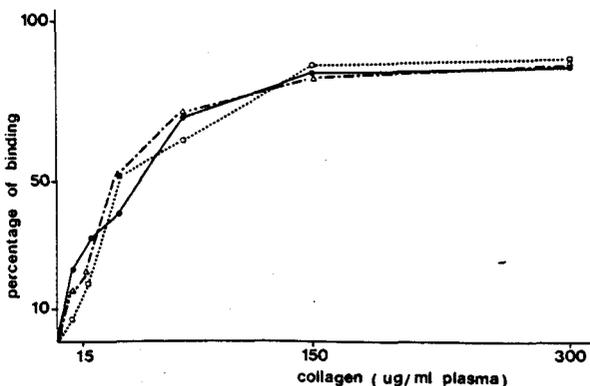


Fig. 4 Effect of anti-vWF monoclonal antibody 211 A6 on vWF binding to human fibrillar collagen type III. ● - 211 A6 ascitic fluid, △ - control ascitic fluid, □ - buffer

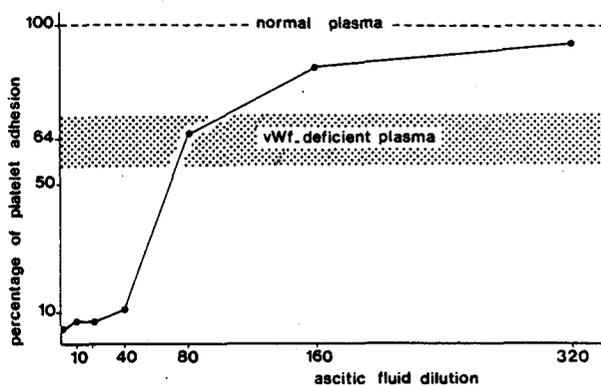


Fig. 6 Inhibition of platelet adhesion to human arterial subendothelium by anti-vWF monoclonal antibody 211 A6. The values are the means of 5 experiments

concentration induced a progressive increase in vWF binding to collagen to a maximum of 90%. Addition of 211 A6 (200 µg IgG/ml) did not modify the vWF binding to collagen (Fig. 4).

Effects on Platelet Adhesion

The effects of 211 A6 on platelet adhesion to collagen and to arterial subendothelium in a perfusion system are shown in Fig. 5 and 6. To study the effect of 211 A6 on platelet adhesion to collagen, glass coverslips were coated with either bovine or human collagen. Similar results were obtained with these two kinds of collagen in the absence of 211 A6. Platelet adhesion to ovine collagen types I and III at a 1000 sec⁻¹ shear rate was greatly affected by the addition of varying dilutions of ascitic fluid 211 A6 to the normal plasma component of the perfusate. A progressive decrease in platelet adhesion was observed as antibody concentration increased (Fig. 5). The number of deposited platelets obtained with normal plasma was $5.69 \pm 1.7 \times 10^6$ plat/m² (mean \pm SD, 13 experiments); this value represented 100% platelet adhesion. The value (18%) obtained with a twenty fold dilution of ascitic fluid corresponding to about 3 µg IgG/ml reconstituted blood was located in the range of the values $1.03 \pm 0.5 \times 10^6$ plat/cm²; (mean \pm SD, 9 experiments) obtained with a perfusate containing vWF-deficient plasma. Platelet adhesion to human collagen was decreased to the same extent in the presence of MAb 211 A6 (data not shown).

Platelet adhesion to subendothelium at a 800 sec⁻¹ shear rate was dramatically affected by 211 A6. The number of deposited platelets (mean of 5 experiments) in the presence of normal plasma was $7.24 \pm 1.13 \times 10^6$ plat/cm² (100% platelet adhesion) and $5.00 \pm 1.25 \times 10^6$ plat/cm² in presence of vWF-deficient plasma. Previous incubation of perfusate with varying ascitic fluid dilutions (1:10 to 1:320) induced a decrease in platelet adhesion. After a progressive decrease up to a value (64%) located in the range of the values obtained with vWF-deficient plasma, a further drop in adhesion of up to 10% was obtained with 3 µg IgG/ml perfusate (Fig. 6).

Discussion

In the present study we describe a monoclonal antibody which binds to the part of purified FVIII/vWF which is present in normal plasma in haemophilia A plasmas but absent in vWD plasma i.e. vWF. In screening for its effects on vWF-related functions, we found it is a potent inhibitor of the following vWF activities:

a) 211 A6 completely inhibits ristocetin-induced platelet aggregation but has no effect on thrombin-induced platelet aggregation.

b) 211 A6 totally inhibits the binding of ¹²⁵I-vWF to platelets in the presence of ristocetin but does not interfere with ¹²⁵I-vWF binding to thrombin-stimulated platelets. Complete inhibition is obtained at an IgG/vWF molecular ratio of 1:1 and an assumed molecular weight of 500 kDa for vWF.

These results are indicative of an inhibition of the vWF domain binding to platelet membrane GP Ib and of the absence of action with the vWF domain binding to GP IIb/IIIa complex.

c) 211 A6 abolishes platelet adhesion to arterial subendothelium and to bovine or human collagen but does not interfere with vWF binding to human fibrillar collagen. This last result indicates that 211 A6 does not react with the vWF domain binding to collagen. The addition of 211 A6 to normal plasma induced a dramatic decrease in platelet adhesion to subendothelium to a level below that obtained with vWF-deficient plasma. The shape of the dose-dependent inhibition curve obtained with various dilutions of ascitic fluid 211 A6 might be due to two phenomena. First 211 A6 inhibits vWF present in reconstituted blood; then, a

greater concentration of monoclonal antibody binds to subendothelium vWF deposited by endothelial cells.

Our results confirm that the vWF domain involved in the binding to collagen is distinct from the vWF domain involved in its binding to GPIb. Furthermore they show that the inhibitory effect of MAb 211 A6 on the vWF binding site to GP Ib is associated with an inhibitory effect on platelet adhesion to subendothelium and to collagen.

At the present time, several murine monoclonal antibodies directed against human vWF have been described. In contrast to 211 A6, some MABs partially inhibited platelet adhesion in the Baumgartner system and had no effect on ristocetin-induced platelet aggregation (22, 31). When MABs have both inhibitory effects, the percentages of inhibition are sometimes not correlated. Thus, MAB H9 described by Meyer et al. (21) attenuated ristocetin-induced platelet aggregation by 20% and inhibited platelet adhesion at high shear rates by 80%. On the other hand Goodall et al. (19, 40) described a MAB RFF-VIII:R/1 which totally inhibited aggregation but only 50% of platelet adhesion. Nevertheless, MABs CLB-RAg 35 (20, 22, 31) and RFF-VIII:R/2 (40) inhibit adhesion to subendothelium and ristocetin-mediated platelet aggregation to the same extent. CLB-RAg 35, like MAB 211 A6, completely blocks ristocetin-induced platelet aggregation (with a final IgG concentration of 1.3 µg/ml), inhibits the binding of FVIII/vWF to platelets in the presence of ristocetin, and inhibits platelet adhesion to subendothelium at high shear rates (20, 22).

The proteolytic fragmentation of vWF was conducted to localise epitopes of some MABs on the subunit of vWF. Thus, the MAB CLB-RAg 35 immunoprecipitates a tryptic fragment of 116 kDa which was found to contain some residual ristocetin cofactor activity (41). In recent studies performed by Fujimura et al. (42), a reduced and alkylated 52/48 kDa tryptic fragment of vWF was able to inhibit ristocetin-induced platelet aggregation in the presence of native vWF and to react with MABs (RG 21, RG 42, and RG 46) which blocked ristocetin-induced platelet aggregation and prevented ristocetin-induced vWF binding to GP Ib receptor. This fragment was localised in the NH₂-terminal region of the vWF polypeptide chain. Girma et al. (43) have shown that MAB 9, which blocks thrombin-induced binding of vWF to platelets (23), binds to Sp II, the *S. aureus* V-8 protease fragment localised on the carboxy-terminal segment of the vWF subunit. In contrast, the epitope recognised by MAB H9 (see above) is localised on Sp III, the amino-terminal segment of the vWF subunit. Furthermore the collagen binding site of vWF was localised with MAB B 203 (44) on Sp III fragment but on a substructure different from those responsible for interaction with platelet receptor GP Ib.

From these data, it seems very likely that MAB 211 A6, which presents the same inhibitory effect as CLB-RAg 35 and, to some extent, H9, recognises an epitope on the NH₂-terminal fragment of vWF subunit. Further precise study on the localisation and extent of this epitope, and comparison with the epitopes recognised by other MABs exhibiting different inhibitory effects is needed in order to determine the structural requirements of the various vWF functions.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. J. P. Allain and H. Lee for their generous gift of ascitic fluid 211 A6 and Dr M F Taillefer for immunofluorescence studies.

The secretarial assistance of Mrs B. Wittouck is gratefully acknowledged.

References

- 1 Jaffe E A, Hoyer L W, Nachman R L. Synthesis of von Willebrand factor by human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 1906-9.
- 2 Howard M A, Montgomery D C, Hardisty R M. Factor VIII-related antigen in platelets. *Thromb Res* 1974; 4: 617-24.
- 3 Nachman R L, Levine R, Jaffe E A. Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes. *J Clin Invest* 1977; 60: 914-21.
- 4 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; 62: 702-09.
- 5 Hoyer L W, Shainoff J R. Factor VIII-related protein circulates in normal plasma as high molecular weight multimers. *Blood* 1980; 55: 1056-9.
- 6 Ruggeri Z M, Zimmermann 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. *J Clin Invest* 1980; 65: 1318-25.
- 7 Titani K, Kumar S, Takio K, Ericsson L H, Wade R D, Ashida K, Walsh K A, Chopek M W, Sadler J E, Fujikawa K. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* 1986; 25: 3171-84.
- 8 Chopek M W, Girma J P, Fujikawa K, Davie E W, Titani K. Human von Willebrand factor: A multivalent protein composed of identical subunits. *Biochemistry* 1986; 25: 3146-55.
- 9 Sadler J E, Shelton-Inloes B B, Sorace J M, Harlan J M, Titani K, Davie E W. Cloning and characterisation of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6394-8.
- 10 Shelton-Inloes B B, Titani K, Sadler J E. cDNA sequences for human von Willebrand factor reveal five types of repeated domains and five possible protein sequence polymorphisms. *Biochemistry* 1986; 25: 3164-71.
- 11 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 rate-dependent decrease of adhesion in von Willebrand's disease and the Bernard Soulier syndrome. *J Lab Clin Med* 1978; 92: 750-64.
- 12 Baumgartner H R, Tschopp T B, Meyer D. Shear rate dependent inhibition of platelet adhesion and aggregation on collagenous surfaces by antibodies to human factor VIII/von Willebrand factor. *Br J Haematol* 1980; 44: 127-39.
- 13 Kao K J, Pizzo S V, McKee P A. Demonstration and characterization of specific binding sites for factor VIII/von Willebrand factor on human platelets. *J Clin Invest* 1979; 63: 656-64.
- 14 Fujimoto T, Ohara S, Hawiger J. Thrombin-induced exposure and prostacyclin inhibition of the receptor for factor VIII/von Willebrand factor on human platelets. *J Clin Invest* 1982; 69: 1212-22.
- 15 Fujimoto T, Hawiger J. Adenosine diphosphate induces binding of von Willebrand factor to human platelets. *Nature* 1982; 297: 154-6.
- 16 Di Minno G, Thiagarajan P, Perussia B, Martinez J, Shapiro S, Trinchieri G, Murphy S. Exposure of platelet fibrinogen-binding sites by collagen, arachidonic acid and ADP: inhibition by a monoclonal antibody to glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1983; 61: 140-8.
- 17 Goodall A H, Meyer D. Registry of monoclonal antibodies to factor VIII and von Willebrand factor. International committee on thrombosis and haemostasis. *Thromb Haemostas* 1985; 54: 878-91.
- 18 Ogata K, Saito H, Ratnoff O D. The relationship of the properties of antihemophilic factor (factor VIII) that support ristocetin-induced platelet agglutination (factor VIII:RC) and platelet retention by glass beads as demonstrated by a monoclonal antibody. *Blood* 1983; 61: 27-35.
- 19 Goodall A H, Jarvis J, Chand S, Rawlings E, O'Brien D P, McGraw A, Hutton R, Tuddenham E G D. An immunoradiometric assay for human factor VIII/von Willebrand factor (VIII:vWf) using a monoclonal antibody that defines a functional epitope. *Br J Haematol* 1985; 59: 565-77.
- 20 Stel H V, Sakariassen K S, de Groot P G, Van Mourik J A, Sixma J J. Von Willebrand factor in the vessel wall mediates platelet adherence. *Blood* 1985; 65: 85-90.
- 21 Meyer D, Baumgartner H R, Edgington T S. Hybridoma antibodies to human von Willebrand factor II. Relative role of intramolecular loci in mediation of platelet adhesion to the subendothelium. *Br J Haematol* 1984; 57: 609-20.
- 22 Stel H V, Sakariassen K S, Scholte B J, Veerman E C, van der Kwast T H, de Groot P G, Sixma J J, van Mourik J A. Characterization of 25 monoclonal antibodies to factor VIII - von Willebrand factor: Relationship between ristocetin induced platelet aggregation and platelet adherence to subendothelium. *Blood* 1984; 63: 1408-15.
- 23 Nokes T C, Mahmoud N A, Savidge G F, Goodall A H, Meyer D, Edgington T S, Hardisty R M. Von Willebrand factor has more than one binding site for platelets. *Thromb Res* 1984; 34: 361-6.
- 24 Schullek J, Jordan J, Montgomery R R. Interaction of von Willebrand factor with human platelets in the plasma milieu. *J Clin Invest* 1984; 73: 421-8.
- 25 Sola B, Avner P, Sultan Y, Jeanneau C, Maisonneuve P. Monoclonal antibodies against human factor VIII molecule neutralize antihemophilic factor and ristocetin cofactor activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 183-7.
- 26 Croissant M P, van de Pol H, Lee H H, Allain J P. Characterization of four monoclonal antibodies to factor VIII coagulant protein and their use in immunopurification of factor VIII. *Thromb Haemostas* 1986; 56: 271-6.
- 27 Ey P L, Prowse S J, Jenkin C R. Isolation of pure IgG 1, IgG 2a and IgG 2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose: *Immunochemistry* 1978; 15: 429-36.
- 28 Mazurier C, Parquet-Gernez A, Samor B, Goudemand M, Montreuil J. Etude de l'antigène lié au facteur VIII (FVIII:Ag). Purification par chromatographie d'immuno-affinité. *C R Acad Sci Paris* 1979; 288: 1431-4.
- 29 Katzman J A, Mujwid D K, Miller R S, Fass D N. Monoclonal antibodies to von Willebrand's factor: Reactivity with porcine and human antigens. *Blood* 1981; 58: 530-6.
- 30 Kasper C K et al. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34: 869-72.
- 31 Sixma J J, Sakariassen K S, Stel H V, Houdjik W P M, In der Maur D W, Hamer R J, de Groot P G, van Mourik J A. Functional domains on von Willebrand factor: Recognition of discrete tryptic fragments by monoclonal antibodies that inhibit interaction of von Willebrand factor with platelets and with collagen. *J Clin Invest* 1984; 74: 736-44.
- 32 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: 18-24.
- 33 Patschke H. Shape and functional properties of human platelets washed with acid citrate. *Haemostasis* 1981; 10: 14-27.
- 34 Goudemand J, Mazurier C, Samor B, Bouquelet S, Montreuil J, Goudemand M. Effect of carbohydrate modifications of factor VIII/von Willebrand factor on binding to platelets. *Thromb Haemostas* 1985; 53: 390-5.
- 35 Sakariassen K S, Bolhuis P A, Sixma J J. Platelet adherence to subendothelium of human arteries in pulsatile and steady flow. *Thromb Res* 1980; 19: 547-59.
- 36 Baumgartner H R. The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of mural thrombi. *Microvasc Res* 1973; 5: 167-79.
- 37 Heyns A du P, Badenhorst P N, Pieters H, Lötter M G, Minnaar P C, Duyvené de Wit L J, van Reenen O R, Retief F P. Preparation of a viable population of ¹¹¹Indium-labeled human blood platelets. *Thromb Haemostas* 1980; 42: 1473-82.
- 38 Jorieux S, Mazurier C, de Romeuf C, Goudemand M. Properties and interests of a monoclonal antibody to human von Willebrand factor (vWf). Bari International Conference on Factor VIII von Willebrand factor 1985, June 10-15. Bari (Abstr).
- 39 Sakariassen K S, Aarts P A M, de Groot P G, Houdjik W P M, Sixma J J. A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrisse and purified components. *J Lab Clin Med* 1983; 102: 522-35.
- 40 Goodall A H, Jarvis J, Rawlings E, Tuddenham E G D. A specific immunoradiometric assay for VIII:vWf using monoclonal antibodies recognising a functional site on VIII:RAG. *Thromb Haemostas* 1983; 50: 111.
- 41 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. *Blood* 1980; 55: 848-58.
- 42 Fujimura Y, Titani K, Holland L Z, Russell S R, Roberts J R, Elder J H, Ruggeri Z M, Zimmerman T S. Von Willebrand factor. A reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 1986; 261: 381-5.
- 43 Girma J P, Kalafatis M, Piétu G, Lavergne J M, Chopek M W, Edgington T S, Meyer D. Mapping of distinct von Willebrand factor domains interacting with platelet GPIb and GPIIb/IIIa and with collagen using monoclonal antibodies. *Blood* 1986; 67: 1356-66.
- 44 Girma J P, Kalafatis M, Piétu G, Lavergne J M, Edgington T S, Meyer D. Mapping of functional domains of human von Willebrand factor using monoclonal antibodies. *Thromb Haemostas* 1985; 54: 59 (Abstr).

Received July 28, 1986 Accepted after revision February 16, 1987

intéressant d'étudier l'effet de cet anticorps sur l'adhésion des plaquettes à basse vitesse de cisaillement.

1) Effet inhibiteur de l'anticorps monoclonal 211 A6 à basse vitesse de cisaillement :

Nos résultats montrent que l'anticorps 211 A6 est encore inhibiteur de l'adhésion des plaquettes au collagène et au sous-endothélium à basse vitesse de cisaillement. Cependant, cet effet inhibiteur est moins marqué à basse vitesse de cisaillement puisqu'il est de 47 % à 270 sec⁻¹ contre 86 % à 1 300 sec⁻¹ au collagène (Fig. 19) et de 51 % à 300 sec⁻¹ contre 69 % à 800 sec⁻¹ au sous-endothélium (Fig.20, Exp.2). On voit également que, pour une vitesse de cisaillement de 200 sec⁻¹, cet effet inhibiteur (34 %) semble encore diminuer (Fig.20, Exp.3). A haute vitesse de cisaillement, l'addition de vWF exogène purifié au perfusat en présence du 211 A6 restaure l'adhésion plaquettaire (Fig. 21).

Ainsi, nos résultats apparaissent différents de ceux d'autres équipes qui montrent qu'un autre anticorps monoclonal (CLB RA9 35) dirigé contre le vWF, également inhibiteur des réactions du vWF avec les plaquettes en présence de ristocétine, n'a un effet inhibiteur sur l'adhésion plaquettaire qu'à des vitesses de cisaillement supérieures à 500 sec⁻¹ (Stel et al., 1985). Les résultats que nous avons obtenu avec cet anticorps aimablement fourni par J. Van Mourik (Centre de transfusion d'Amsterdam) (Tableau IV) montrent que l'effet inhibiteur de l'adhésion des plaquettes au collagène à 1 300 sec⁻¹ (23 %) est moins important que celui rapporté dans la littérature (90 %) (Sixma et al., 1974b). De même, au sous-endothélium (Tableau V), l'effet inhibiteur à 850 sec⁻¹ est de 25 % alors que celui vu dans la littérature est de 45 %. Par contre, à basse vitesse de cisaillement, cet effet inhibiteur au collagène et au sous-endothélium disparaît en accord avec la littérature et contrairement à ce que l'on observe avec le 211 A6.

2) Etude d'autres anticorps monoclonaux dirigés contre le vWF :

L'étude de 16 anticorps monoclonaux dirigés contre le vWF, du laboratoire, a permis de mettre en évidence deux anticorps (21 A11 et 21 H12) inhibiteur de l'adhésion plaquettaire au collagène (Tableau VI).

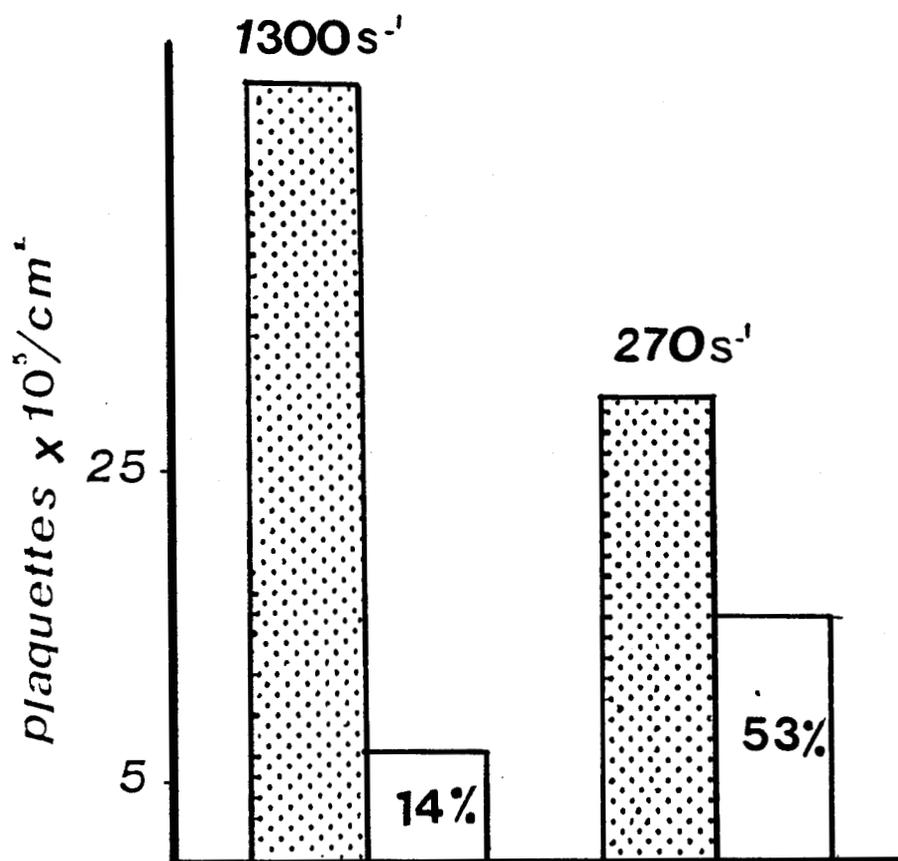


Figure 19 : INFLUENCE DE LA FORCE DE CISAILLEMENT SUR L'INHIBITION DE L'ADHESION PLAQUETTAIRE AU COLLAGENE I, III HUMAIN PAR L'ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-vWF 211 A6.

Le sang perfusé (16 ml) reconstitué avec du plasma normal est préincubé 10 min. à 37°C avec 160 μ l de tampon (▤): 100 % Adhésion) ou avec 160 μ l de liquide d'ascite dilué 50 fois (□). (temps de perfusion : 5 minutes).

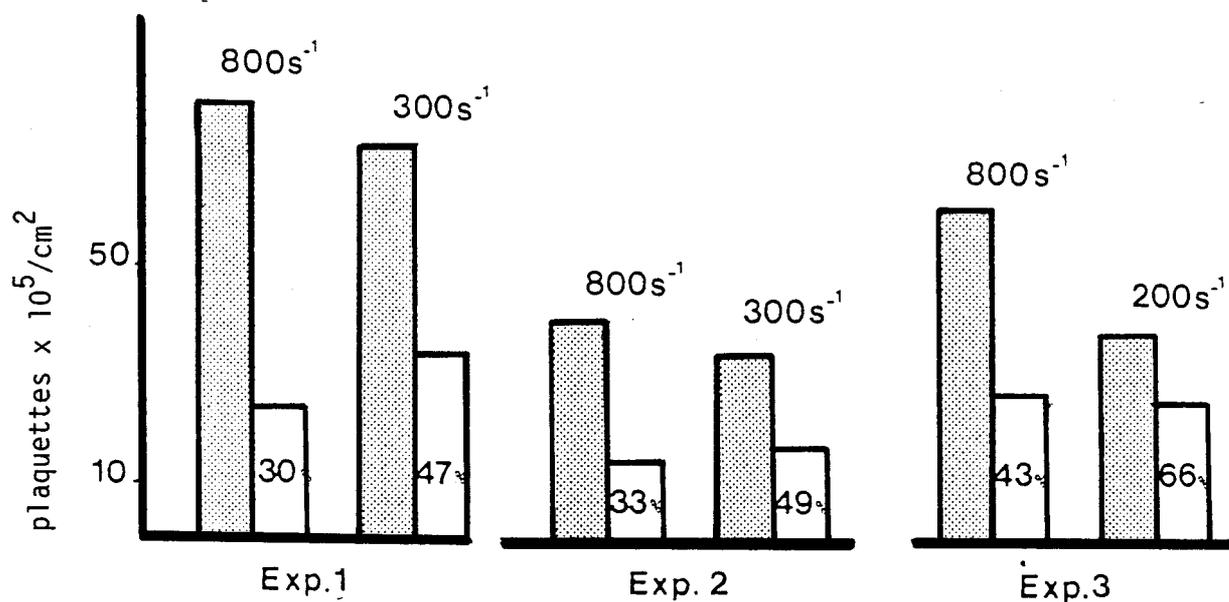


Figure 20 : ADHESION PLAQUETTAIRE AU SOUS-ENDOTHELIUM D'ARTERE OMBILICALE EN PRESENCE DE L'ANTICORPS MONOCLONAL 211 A6.

 100 % d'adhésion

 dilution du liquide d'ascite au 1/80ème 10 µL/ml de sang.

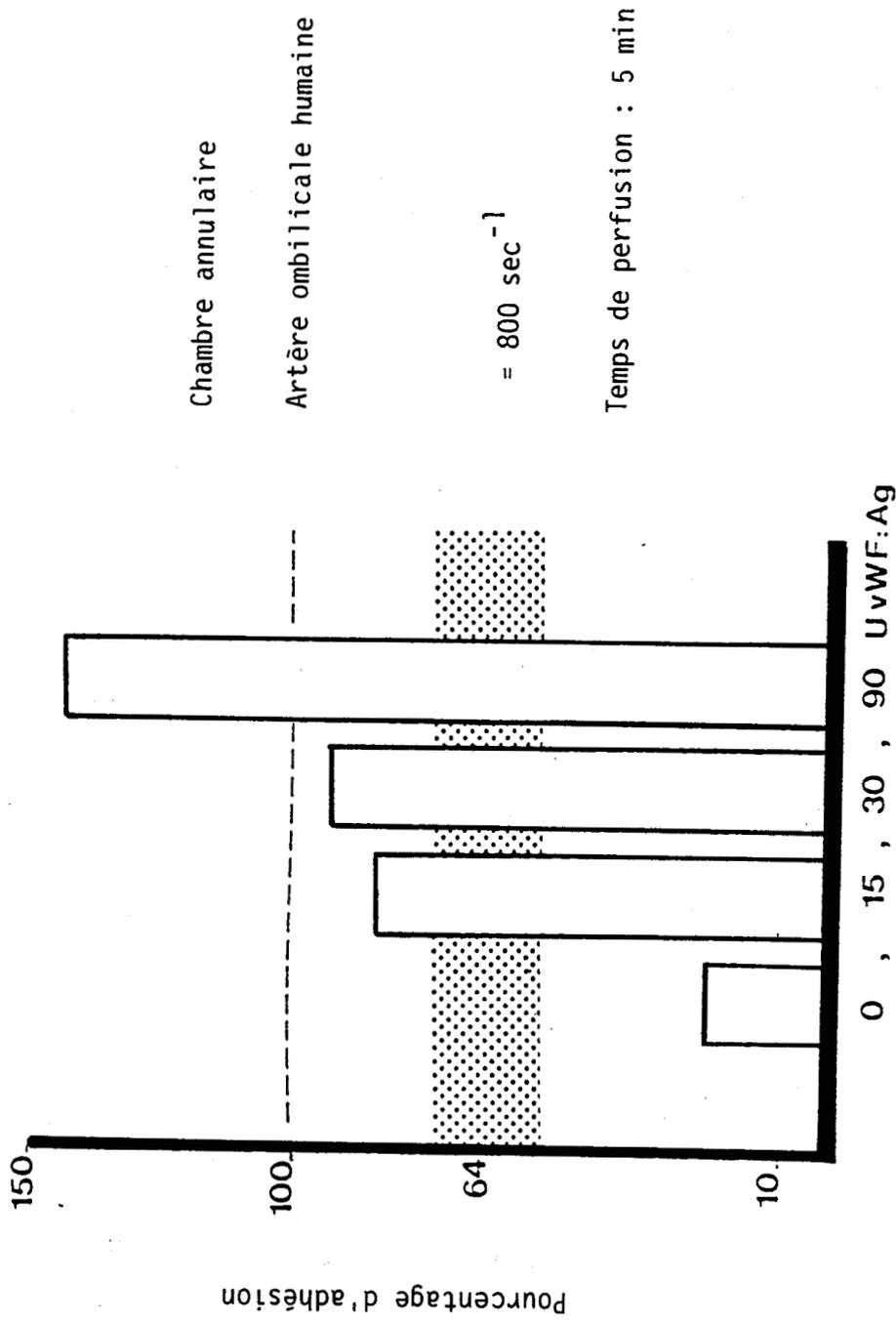


Figure 21 : CORRECTION DE L'ADHESION PLAQUETTAIRE EN PRESENCE D'UN ANTICORPS MONOCLONAL 211 A6 PAR ADDITION DE vWF PURIFIE.

Une dilution au 1/50 du liquide d'ascite (160 µl) et des taux croissants de vWF purifiés préalablement incubé pendant 10 min à 37 °C, sont incubés pendant 10 min à 37 °C avec les 16 ml de perfusat.

Vitesse de cisaillement sec	1 300	450	290
Témoïn	n=2 46.7 ± 6.7 100 %	n=2 46.5 ± 9 100 %	-
CLBRAg 35 75 µg IgG/ml de sang	n=1 36 77 %	n=1 50 107 %	-
Témoïn	49.9 ± 9 100 %	-	29.5 ± 0.7 100 %
211 A6 2.75 µg IgG/ml de sang	6.9 ± 0.7 14 %	-	15.6 ± 3 53 %

Tableau IV : Adhésion des plaquettes au collagène I, III non fibrillaire à différentes vitesses de cisaillement en présence de plasma normal préalablement incubé (10 min, 37 °C) avec des liquides d'ascites (temps de perfusion : 5 min)

Vitesse de cisaillement sec ⁻¹	850	260	200
Témoïn	n=2 57.6 ± 3.3 100 %	42.7 ± 1.9 100 %	-
CLBRag 35 (150 µl/160 l) 75 µg IgG/ml de sang	43.4 75 %	46.6 114 %	-
Témoïn	52.3 ± 5.7 100 %	-	37.9 ± 6 100 %
211 A6 (3.2 ml/16 ml) 2.7 µg IgG/ml de sang	22.5 ± 2.5 43 %	-	2.53 ± 1.1 67 %

Tableau V : Adhésion des plaquettes au sous-endothélium d'artère ombilicale humaine à différentes vitesses de cisaillement en présence de plasma normal préalablement incubé (10 min à 37 °C) avec des liquides d'ascites (temps de perfusion 5 min)

Liquide d'ascite pur 10 μ l/ml de sang		Taux IgG (g/l)	% inhibition de l'adhésion plaquettaire	
			Collagène I, III η f = 1 300 sec^{-1} t = 3 min	sous-endothélium = 800 sec^{-1} t = 5 min
211 A6		123	90 *	90.4
6364	21 A11	15	88	32 (p < 0.02)
	21 H12	7.9	85 *	32 (p < 0.02)
	23 G2	14.8	28 (p < 0.01)	nd
9333	C12	2.7	16 (p < 0.2)	nd
	B7	1.1	10 (p < 0.05)	nd
	E2	9.2	7	nd
	B3	nd	9 (p < 0.3)	nd
	F1	8.1	0	nd
	E12	11	21 (p < 0.3)	nd
	F10	4.7	15 (p < 0.6)	30 (p < 0.1)
	H1	5.75	0	24 (p < 0.2)
	E8	7.7	8	30 (p < 0.2)
	A7	nd	9 (p < 0.3)	nd
2113	C11	5.1	26 (p < 0.02)	nd
2112	C1	11	26 (p < 0.05)	nd
9311	A2	5.92	22 (p < 0.01)	nd

* : dilution 1/10 du liquide d'ascite
p : test de Student

Tableau VI : Pourcentage d'inhibition de l'adhésion plaquettaire au collagène et au sous-endothélium en présence de plasma normal préalablement incubé (10 min à 37 °C) avec des ascites contenant des anticorps monoclonaux dirigés contre le vWF. Les valeurs sont les moyennes d'au moins 3 passages dans le système de perfusion.

La figure 22 montre que le pourcentage d'adhésion résiduelle augmente d'une façon similaire pour les deux anticorps en fonction des dilutions des liquides d'ascite.

Ainsi pour une dilution au 1/10 des ascites, le pourcentage d'inhibition de l'adhésion des plaquettes au collagène est important puisqu'il est de l'ordre de 85 %. Par contre, cette même dilution du 21 A11 n'induit pas d'inhibition de l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium (Tableau VII). Il semble pourtant que le 21 A11 et le 21 H12 utilisés purs provoquent un léger effet inhibiteur (32 %) sur l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium.

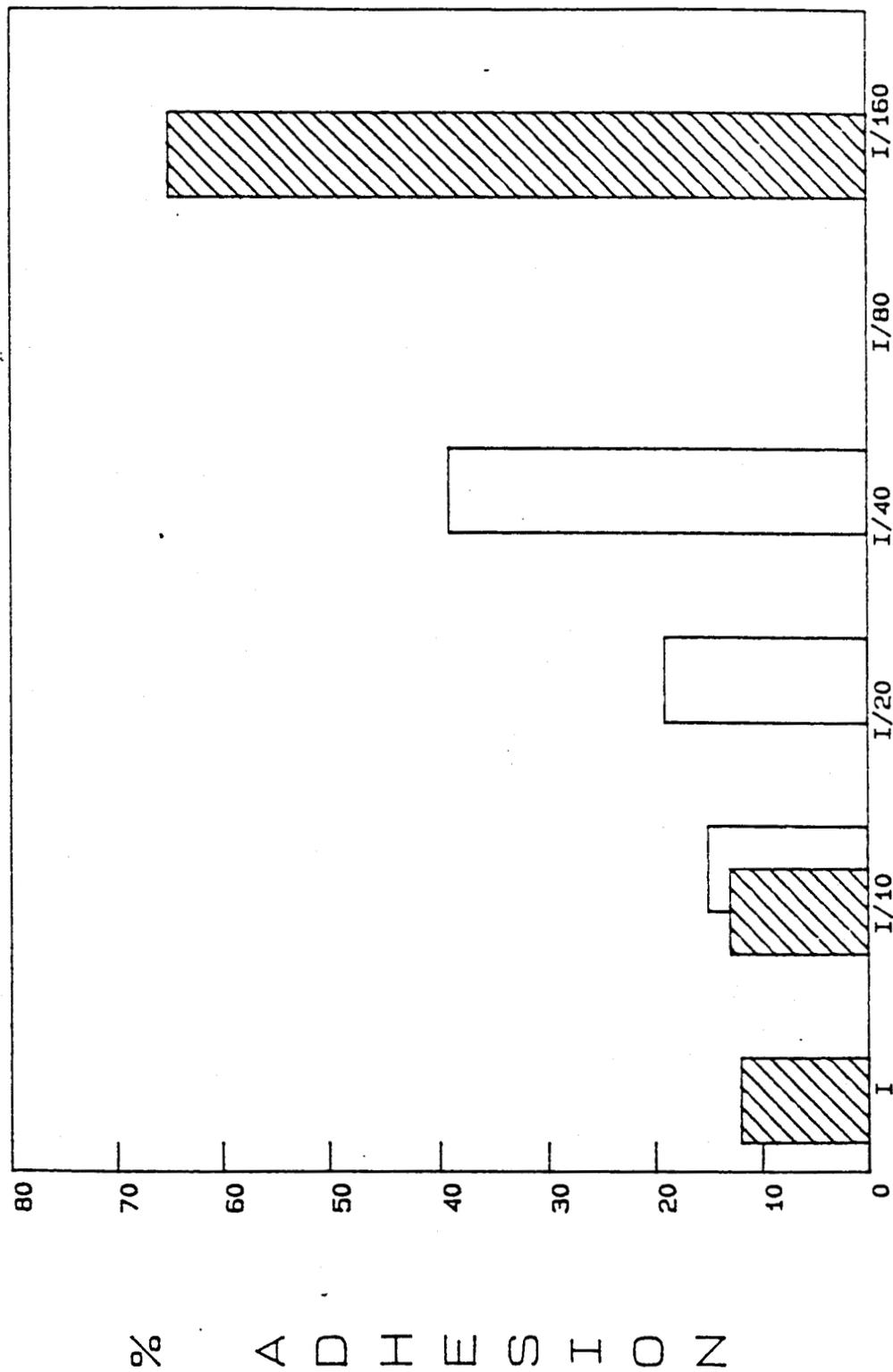
Ces deux anticorps ont par ailleurs été trouvés inhibiteur de la fixation du vWF aux fibres de collagène (Binding collagen) (Figure 23). Nous avons également mesuré, en utilisant du vWF radiomarqué, l'effet de ces anticorps sur la première étape de l'adhésion plaquettaire qu'est la fixation du vWF au collagène ou au sous-endothélium dans le système de perfusion. L'anticorps 21A11 (dilué au 1/10) a un effet inhibiteur sur la fixation du vWF au collagène alors qu'à cette même concentration, la fixation du vWF au sous-endothélium n'est pas perturbée. Malheureusement, nous n'avons pas pu étudier cet effet avec le 21H12 non dilué (Tableau VII).

Cette même expérience faite avec l'ascite 211 A6 diluée au 1/10 montre que cette dilution d'anticorps n'inhibe pas la fixation du vWF au sous-endothélium et au collagène alors qu'elle induit une forte diminution de l'adhésion plaquettaire (Tableau VII).

DISCUSSION

L'effet inhibiteur de l'anticorps 211A6 sur l'adhésion des plaquettes à basse vitesse de cisaillement semble montrer que le vWF serait également impliqué dans l'adhésion des plaquettes à basse vitesse de cisaillement. Aussi, afin d'éliminer tous risques d'erreurs dus à notre système d'étude, nous avons étudié l'effet inhibiteur du CLBRAg 35 qui a été montré inhibiteur de l'adhésion plaquettaire uniquement à haute vitesse de cisaillement (Stel et al., 1985). Cependant, bien que les résultats montrent qu'il n'y a pas d'effet inhibiteur du CLBRAg 35 à basse vitesse de cisaillement, on note que le lot d'anticorps que nous avons testé est moins inhibiteur que celui décrit dans la littérature. L'anticorps 211A6 apparaît néanmoins avoir un effet inhibiteur très important puisqu'à une

adh. collagene mab 21A11, 21H12



dilution des mab

Figure 22 : Adhésion des plaquettes au collagène I, III nF, en présence de plasma normal préalablement incubé (10 min, 37°C) avec différentes dilutions des anticorps monoclonaux dirigés contre le vWF 21 A 11 [hatched] et 21 H 12 [white] (\bar{X} = 1 300 sec⁻¹, tps = 3 min).

	Adhésion plaquettaire		Fixation du vWF	
	collagène	sous-endothélium	collagène	sous-endothélium
211 A6	10 **	9.6 **	87 **	89.5 *
21 A11	13 **	68 * 100 **	3 **	97 **
21 H12	15 **	68 *	23 *	nd

Tableau VII : Pourcentage d'adhésion plaquettaire et de fixation du vWF au collagène I, III nf ($\gamma = 1\ 300\ \text{sec}^{-1}$) et au sous-endothélium ($\gamma = 800\ \text{sec}^{-1}$) en présence d'anticorps monoclonaux (160 $\mu\text{l}/16\ \text{ml}$ de sang) dirigés contre le vWF

* : ascite pur

** : ascite dilué au 1/10

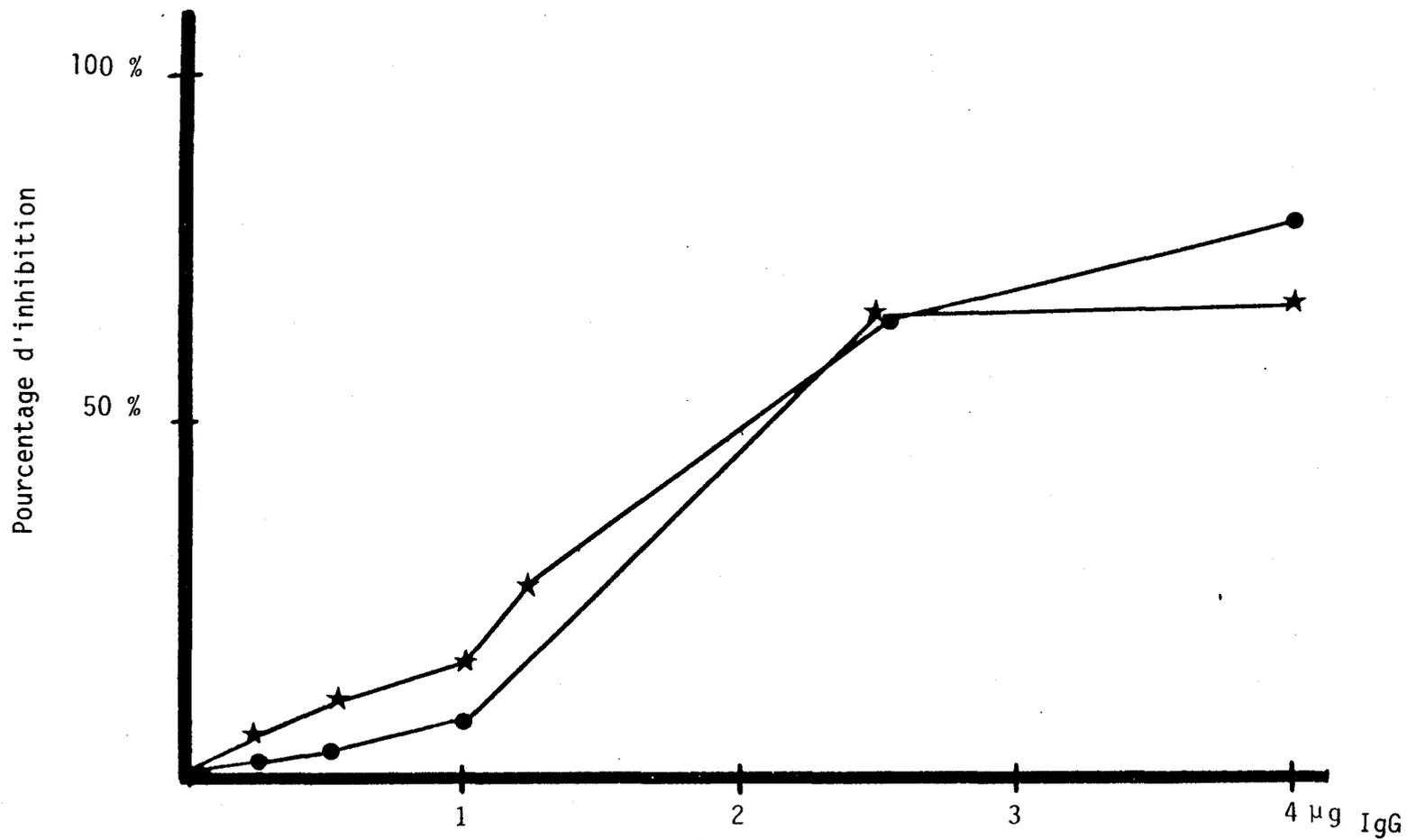


Figure 23 : Pourcentage d'inhibition de la fixation du vWF plasmatique (0.25 u) aux fibres de collagène de type I, III en présence de différentes quantités d'anticorps monoclonaux 21 A 11 (★) et 21 H 12 (●) dirigés contre le vWF.

concentration 10 fois inférieure à celle du CLBRAg 35 utilisée dans la littérature, il provoque le même effet inhibiteur.

Ainsi la forte affinité du 211A6 pour le vWF pourrait mettre en évidence un rôle du vWF, dans l'adhésion plaquettaire à basse vitesse de cisaillement, non décelé avec un anticorps moins puissant. En faveur d'un rôle du vWF à faible vitesse de cisaillement, il est également possible que le 211 A6 reconnaisse un épitope, proche mais différent de celui du CLBRAg 35, qui serait impliqué dans l'adhésion des plaquettes à basse vitesse de cisaillement. De nombreuses expériences sont encore nécessaires pour tenter d'expliquer cet effet inhibiteur particulier. Il serait par exemple intéressant de voir si l'inhibition de l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium à 300 sec^{-1} est levée par l'addition de vWF purifié exogène et de comparer les épitopes des anticorps 211 A6 et CLB RAg 35.

A haute vitesse de cisaillement, les expériences utilisant du vWF radiomarké dans le système de perfusion ont montré, qu'en présence de l'anticorps 211 A6, la fixation du vWF sur le collagène est normale alors que l'adhésion plaquettaire normalement consécutive à cette fixation du vWF est fortement diminuée. Cette inhibition de l'adhésion plaquettaire observée en présence de l'anticorps 211 A6 est due à l'inhibition de l'interaction du vWF avec la plaquette, ce qui est en accord avec le fait que cet anticorps est inhibiteur de l'interaction des plaquettes avec le vWF en présence de ristocétine.

Les travaux effectués avec les anticorps monoclonaux du C.R.T.S. de Lille montrent que seuls 2 anticorps sur 16 testés sont fortement inhibiteurs de l'adhésion des plaquettes au collagène. Dans le tableau VI, nous voyons que certains anticorps apparaissent avoir un léger effet inhibiteur de l'adhésion des plaquettes au collagène ; cependant, ces anticorps n'ont pas été trouvés inhibiteurs de la fixation du vWF au collagène I, III fibrillaire. Il semble donc que ce léger effet inhibiteur soit non spécifique.

Par contre, dans le système purifié utilisant du collagène I, III non fibrillaire on peut dire que le 21A11 et le 21H12 sont bien inhibiteurs de l'adhésion des plaquettes au collagène. En effet, en présence de ces anticorps, l'adhésion des plaquettes au collagène est diminuée à haute force de cisaillement, alors que l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium n'est que très légèrement diminuée. Cet effet inhibiteur de

l'adhésion plaquettaire au collagène est encore bien observé lorsque l'on dilue les liquides d'ascite au 1/10 et au 1/20, montrant une bonne affinité et une bonne spécificité de ces anticorps pour le vWF. L'effet inhibiteur de certains anticorps sur l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium ne semble pas significatif ($p < 0.1$). Ces anticorps n'ont d'ailleurs pas été trouvé inhibiteur des différentes propriétés du vWF que l'on étudie au laboratoire : "Binding collagen", fixation aux plaquettes en présence de ristocétine ou de thrombine. Cependant, il reste de nombreux anticorps à étudier dans le système d'adhésion au sous-endothélium. En utilisant du vWF radiomarké dans le système de perfusion, nous avons montré que ces anticorps 21A11 et 21H12 inhibaient la fixation du vWF au collagène, qui est une des premières étapes nécessaire à l'adhésion des plaquettes à haute vitesse de cisaillement. Ces résultats sont en accord avec l'effet inhibiteur de ces anticorps sur la fixation du vWF au collagène soluble et collagène fibrillaire. Par contre, la même dilution du 21A11 qui inhibe la fixation du vWF au collagène, n'a pas d'effet sur la fixation du vWF au sous-endothélium montrant que le vWF peut se fixer au niveau du sous-endothélium sur d'autres constituants que le collagène pour induire l'adhésion plaquettaire. De plus, il a été montré que le vWF du sous-endothélium était impliqué dans l'adhésion des plaquettes, et donc, puisque ce vWF est déjà constitutionnellement fixé au sous-endothélium, il doit être capable d'induire l'adhésion des plaquettes en présence des anticorps 21 A11 et 21 H12. Pourtant, il apparaît un léger effet inhibiteur de l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium en présence des ascites 21 A11 et du 21 H12 non dilués qui nécessite d'autres expériences et notamment l'étude de la fixation du vWF au sous-endothélium en présence des ascites non dilués.

L'étude de ces anticorps monoclonaux (211A6, 21A11, 21H12) qui sont inhibiteurs de l'adhésion plaquettaire confirment que plusieurs sites fonctionnels du vWF sont responsables de l'adhésion des plaquettes. En effet, puisque le vWF sert de lien entre une matrice (le sous-endothélium ou le collagène, dans nos système d'étude) et la plaquette sanguine, l'inhibition de l'adhésion peut être due soit à l'inhibition de la fixation du vWF sur la matrice, soit à l'inhibition de la fixation de la plaquette sur le vWF. Ainsi, sur les 3 anticorps monoclonaux fortement inhibiteurs de l'adhésion plaquettaire, on peut distinguer d'une part, le 21A11 et le 21H12 qui inhibent l'interaction du vWF avec le collagène et d'autre part le 211A6 qui inhibe l'interaction de la plaquette avec le vWF (Fig.24).

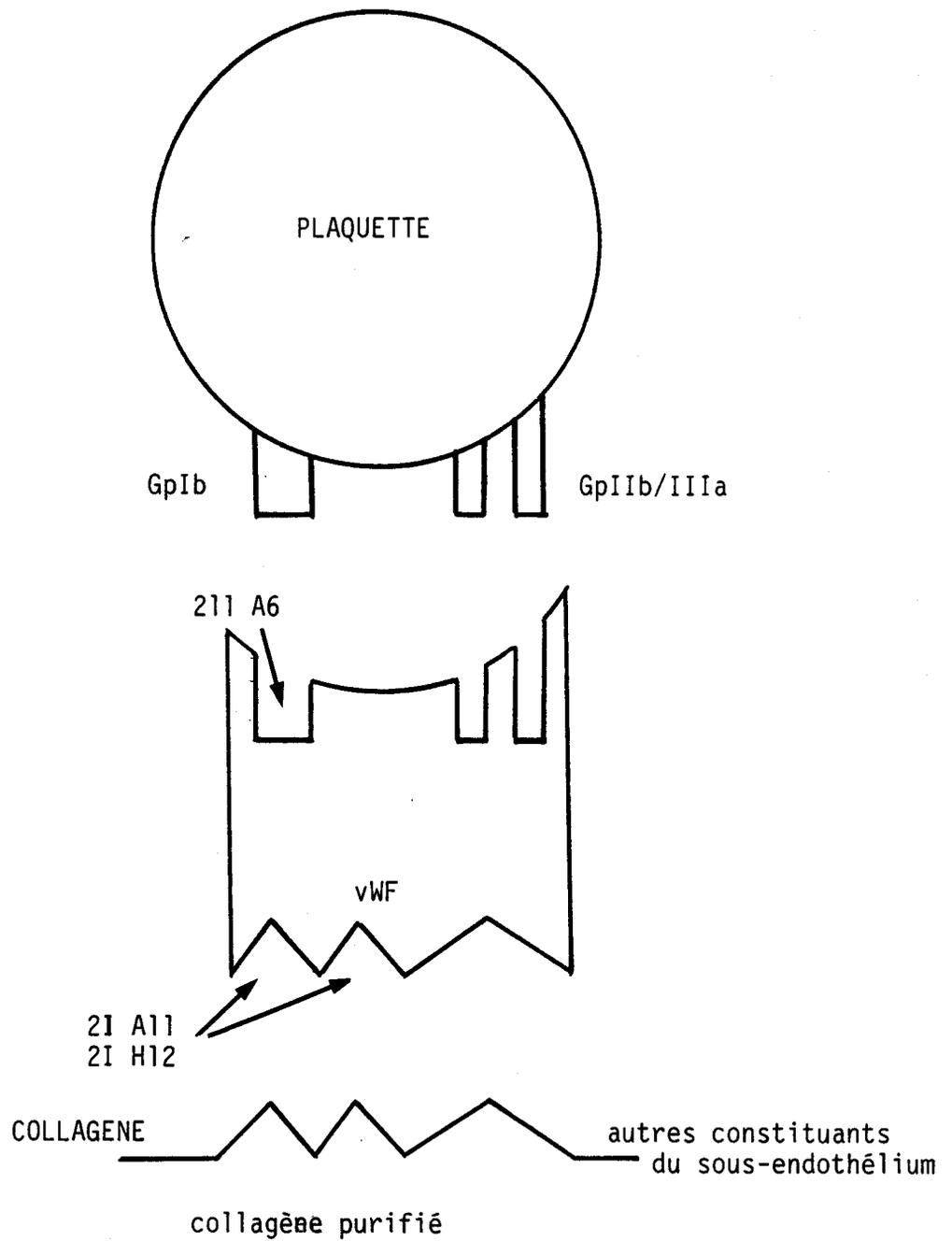


Figure 24 : SCHEMA EXPLICITANT L'EFFET INHIBITEUR SUR L'ADHESION PLAQUETTAIRE DES ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE LE vWF.

L'action de l'anticorps 211 A6 induit donc une diminution simultanée de l'adhésion des plaquettes au collagène et de l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium. Le récepteur plaquettaire qui ne peut en présence du 211A6 se fixer sur le vWF et induire l'adhésion plaquettaire semble bien être la GpIb puisque cet anticorps inhibe les réactions plaquettaires en présence de ristocétine impliquant cette glycoprotéine plaquettaire. D'après des travaux récents (Fujimura et al., 1986), il semble donc vraisemblable que le 211 A6 se fixe sur la région NH₂ t du vWF (Sp III), sur ou proche du site reconnu par la GpIb plaquettaire.

En ce qui concerne le mode d'action des anticorps 21A11 et 21H12, il a été dernièrement démontré qu'il existait deux sites de fixation du collagène sur le vWF (Roth et al., 1986) et il est donc possible que ces deux anticorps ne soient pas dirigés contre le même site. Il sera donc nécessaire d'approfondir cette question par l'étude de l'action simultanée de ces anticorps sur l'adhésion des plaquettes et sur la fixation du vWF au collagène et la localisation des épitopes de ces deux anticorps.

III - CAPACITE DE DIFFERENTS CONCENTRES THERAPEUTIQUES RICHES EN FVIII A INDUIRE L'ADHESION PLAQUETTAIRE :

Une des activités du C.R.T.S. de Lille est la production de concentrés thérapeutiques riches en complexe FVIII/vWF destinés au traitement de l'hémophilie A ou de la maladie de Willebrand. Il y a quelques années, ces deux types de maladies étaient essentiellement traités par injections de cryoprécipités. Cependant, un des inconvénients de l'utilisation de ces cryoprécipités est lié à leur faible activité spécifique : 0.15 U/FVIII:C et 0.25 U de vWF:Ag/mg de protéines. Ainsi, ce traitement d'une part nécessite des volumes d'injection importants, et d'autre part peut induire une hyperfibrinogénémie. Aussi, durant ces dernières années, la majorité du plasma a servi à la production de produits plus concentrés en FVIII (AS : 0.5 U FVIII:C/mg). Néanmoins, la plupart de ces concentrés très efficaces chez l'hémophile se sont révélés inefficaces dans le traitement de la vWD bien que contenant encore du vWF:Ag, et le C.R.T.S. a dû mettre au point un produit enrichi en vWF spécialement adapté au traitement de la vWD, appelé concentré "spécial vWD" (Mazurier et al., 1982).

Dernièrement, l'apparition du virus HIV et le risque de contamination par les concentrés thérapeutiques a nécessité le développement de procédés d'inactivation virale. Le chauffage a tout d'abord été utilisé

(Martinache et al., 1985), ce traitement ne nuit pas aux propriétés biologiques des concentrés de FVIII ce qui permet son utilisation chez les hémophiles. Par ailleurs, nous avons montré que le concentré de FVIII chauffé contient des formes de vWF efficaces dans la vWD (Mazurier et al., 1987). Par contre, le chauffage des cryoprécipités et des concentrés "spécial vWD" les rend insolubles.

Néanmoins, le risque de contamination virale par le virus de l'hépatite non-A non-B, bien que diminué, n'étant pas complètement éliminé par le chauffage, le C.R.T.S. de Lille a utilisé une autre technique d'inactivation virale basée sur le traitement chimique (Prince et al., 1986) (solvant - détergent : "SD") des concentrés qui se révèle efficace aussi bien pour le virus HIV que le virus de l'hépatite non-A non-B. Les concentrés de FVIII après traitement chimique (SD) demeurent efficaces dans le traitement de l'hémophilie et assurent la meilleure protection vis à vis du risque de contamination virale. Cependant, ces produits se sont avérés peu efficaces chez certains vWD. De ce fait, le seul traitement très efficace de la vWD est le cryoprécipité congelé fait à partir de moins de 10 donneurs de sang afin de réduire au maximum le risque de contamination virale.

C'est dans le but d'étudier l'effet de différents protocoles de préparation ou d'inactivation virale des concentrés de FVIII sur le vWF que nous nous sommes attachés à comparer la capacité de correction de l'adhésion plaquettaire de différents lots de concentrés de FVIII. De plus, afin de disposer, pour l'avenir, d'éléments pronostics pouvant permettre de préjuger de l'efficacité de concentrés de FVIII/vWF dans la maladie de vWD, nous avons comparé les résultats obtenus avec le système de perfusion avec les taux de cofacteur de la ristocétine, le profil multimérique du vWF et les effets cliniques de différents produits.

A. PUBLICATION (cft. p. 126 à 132)

Dans cet article, nous avons étudié des concentrés de FVIII qui ont été traités par le chauffage (96 h à 68 °C) afin d'assurer l'inactivation du virus HIV. Cette inactivation n'induit qu'une légère diminution de l'activité coagulante du FVIII, et, ainsi, le produit reste efficace dans le traitement de l'hémophilie A.

In vitro and in vivo Evaluation of a Factor VIII Concentrate Heat-Treated to Inactivate HTLV-III/LAV Viruses

Favourable Effects of Heating on the von Willebrand Factor

Claudine Mazurier, Christophe de Romeuf, Armelle Parquet-Gernez, Sylvie Jorieux, Maurice Goudemand

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

Abstract. We report here the results of our evaluation of the effects of a dry heat treatment (96 h at 68 °C) to eliminate LAV/HTLV-III virus on factor VIII (FVIII) and von Willebrand factor (vWf) present in an intermediate-purity concentrate. This thermal inactivation appears to have little effect on FVIII. There is an acceptable loss ($12.3 \pm 3.6\%$; $n=25$) in FVIII coagulant activity (FVIII: C) and a good in vivo performance in haemophilia A patients. A precise analysis of vWf indicates that whereas the vWf antigen and its ristocetin cofactor activity decrease during heating, there is an increase in potentially functional forms of vWf. Heat treatment induces an increase in high molecular weight forms of vWf and an enhancement in platelet adhesion to collagen. These changes probably explain the correcting effect on the bleeding time of the heated FVIII concentrate in patients with von Willebrand's disease. Thus, this heat-treated concentrate appears to be equivalent to the untreated product in haemophilia A, with the additional benefit of being efficient for the treatment of von Willebrand's disease.

Introduction

Lyophilised factor VIII (FVIII) concentrates used to treat patients with haemophilia and prepared at the Regional Blood Transfusion Centre (CRTS) Lille are prepared from cryoprecipitate obtained from large pools of plasma from voluntary blood donors. Whereas the prevalence of anti-LAV/HTLV-III antibodies in haemophilia A patients treated exclusively with our product (30 out of 213 in 1985) is lower than the level found in most other studies, it is obvious that it may transmit LAV/HTLV-III virus. As the serious nature of AIDS justifies a pragmatic approach, it was decided in France to screen each blood bag for anti-LAV/HTLV-III antibody as from August 1985 and to switch to heat-treated concentrates as from October 1985.

A dry heat treatment for 96 h at 68 °C was previously demonstrated to inactivate LAV virus spiked in our product [L. Montagnier, pers. communication]. To assess its effect on FVIII and von Willebrand's factor (vWf), we compared the in vitro and in vivo characteristics of

unheated and heated vials of our product. The heating proved to cause no substantial damage to FVIII and was surprisingly favourable to vWf.

Materials and Methods

Patients

All patients gave their informed consent for in vivo evaluations. 3 patients with severe haemophilia A (FVIII coagulant activity, FVIII: C < 0.01 U/ml) and 1 patient with moderate haemophilia A (FVIII: C = 0.01 U/ml) were studied. They received a single infusion of a dose of 23-31 IU FVIII: C/kg body weight (b.w.). 3 patients with von Willebrand's disease (vWD) received heated FVIII concentrate. The dose given was 25-31 IU FVIII: C/kg b.w. One of these patients (Z.A.) was bleeding at the time of infusion. An other vWD patient received heated FVIII concentrates during treatment for haemorrhax.

Blood was sampled before and 1, 3, 6, 12, 24 and 48 h after infusion. Bleeding time was measured according to the Duke or Ivy method with a template device. Citrated plasma was prepared by centrifugation at 2,000 g for 20 min and kept frozen at -25 °C until studied. Plasma volume, FVIII recovery and half-life were calculated as described by Allain [1].

Material

FVIII concentrate prepared by the CRTS Lille is an intermediate-purity concentrate containing about 25 IU FVIII:C/ml with a specific activity around 0.4 IU FVIII:C/mg protein. It is produced by cryoprecipitation of plasma, removal of vitamin-K-dependent factors by aluminium hydroxide adsorption and cold precipitation of fibronectin in the presence of heparin. After addition of *L*-lysine chloride, trisodium citrate and sodium chloride, the solution obtained is clarified, concentrated by ultrafiltration and submitted to sterilizing filtrations before lyophilisation.

Vials of lyophilised FVIII concentrate were heat-treated at 68 °C for 96 h, whereas selected vials serving as unheated controls were stored directly at 4 °C. The inactivation of LAV viruses was previously proved [L. Montagnier, pers. communication] by measuring both reverse transcriptase activity and infectivity for T lymphocytes of some samples of our FVIII concentrate seeded with a measured quantity ($>10^3$ infectious units/ml) of LAV virus and submitted to lyophilisation and heat treatment.

Methods

Solubility of concentrates was determined at 37 °C after reconstitution with prewarmed distilled water. Solubility was assessed as good if it amounted to less than 10 min. The dissolved concentrates were filtered through a needle filter (5 µm) and immediately tested for FVIII:C and ristocetin cofactor activity, then stored at -20 °C for further studies. To investigate FVIII:C stability, the reconstituted material was kept at room temperature for 24 h and tested after 4 and 24-hour storage periods.

FVIII:C was measured in concentrates by both one-stage [2] and two-stage [3] methods. The standard used was the French Standard for FVIII concentrate (85-FE 001), an intermediate-purity material calibrated against the European Standard for FVIII concentrate (C1/84) prepared by the Amsterdam Blood Transfusion Centre and previously calibrated against the 3rd International Standard for Blood Coagulation Factor VIII (80/556) provided by the NBSC (London). One-stage assay and 80/511 standard were used for plasma FVIII:C determinations.

Factor VIII antigen (FVIII:Ag) assay was performed with an IRMA method [4]. Von Willebrand factor antigen (vWf:Ag) was estimated by an enzyme linked-immunoassay already described [5]. Ristocetin cofactor activity was assayed by aggregometry using fresh washed platelets [6].

All FVIII/vWf-related antigens and activities are expressed in IU/ml or IU/dl and standardised (except for FVIII:C in concentrates) with the first International Reference Preparation (80/511) provided by the NBSC (London).

Platelet Adhesion Assay: Perfusion experiments were performed according to Sakariassen et al. [7] with a 1-mm deep rectangular chamber containing glass coverslips coated with 30 µg/cm² purified human collagen [8]. Reconstituted FVIII concentrates were dialysed for 4 h at 4 °C against Krebs-Ringer buffer containing 19 mM trisodium citrate, 2.5 mM CaCl₂ and 5 mM glucose and added to a 4% human serum albumin (HAS, CRTS Lille) solution. Total perfusate (16 ml) was incubated for 5 min at 37 °C before a 3-min perfusion run at a shear rate of 1,200 s⁻¹. The rinsed coverslip radioactivity and the specific radioactivity of ¹¹¹In-labelled platelets was measured with a gamma counter. Platelet adhesion was expressed by the number of adherent platelets/cm² or as a percentage of platelet adhesion, 100%

Table I. FVIII/vWf-associated parameters (mean ± SD) in 5th batches of FVIII concentrate before and after heat treatment (HT)

	FVIII, U/ml		vWf, U/ml		
	FVIII: C		FVIII: Ag	vWf: Ag	ristocetin cofactor activity
	One-stage	Two-stage			
Before HT	24.78 ± 2.58	24.56 ± 3.07	42.06 ± 4.68	126.8 ± 4.60	46 ± 4.36
	21.76 ± 2.62	22.16 ± 3.05	38.26 ± 2.89	98.8 ± 11.95	34.8 ± 3.35
After HT					

being the value obtained when the perfusate is reconstituted blood containing normal human plasma instead of HSA and 0% being the value obtained with perfusate containing HSA alone.

Multimeric distribution of vWf was analysed using an SDS-agarose system [9] leading to the resolution of each multimeric unit of plasma vWf into 5 bands ('quintuplet pattern'). The concentrates were prediluted in physiologic buffer to about 1 U vWf:Ag/ml and then tested in dilutions of 1:10 or 1:20 in dissociating buffer. Scanning of the bands obtained after autoradiography was performed with a Helena densitometer.

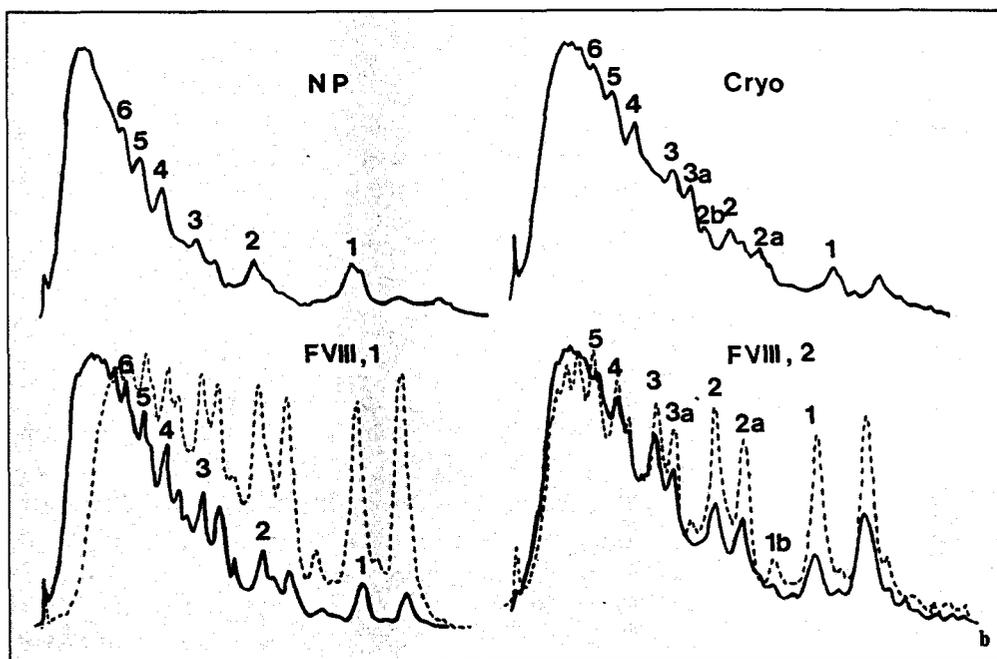
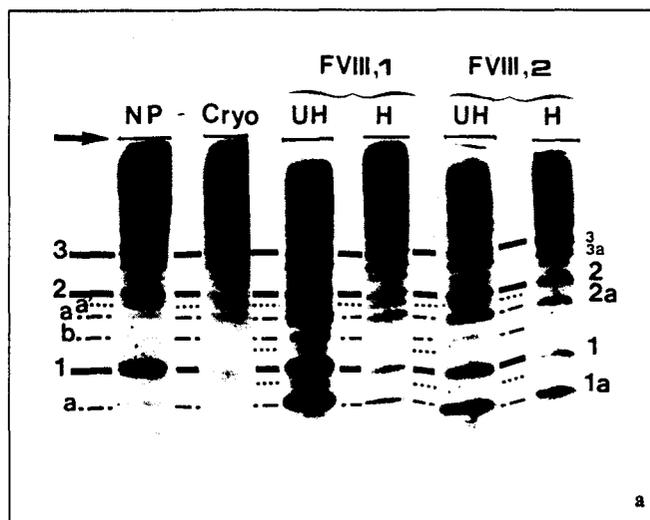
Results

In vitro Evaluation

The solubility of the heat-treated concentrate was good, but small filaments not seen with non-inactivated product were sometimes visible before filtration through the needle filter.

Our product tolerated heat treatment with a loss of FVIII:C assessed by one-stage assay equal to 12.3 ± 3.6% (mean ± 1SD; n=25). Changes in FVIII/vWf-associated parameters after heat treatment of 5 different batches are reported in table I. The mean of FVIII:C loss estimated on one-stage and two-stage data was 12.3 and 9.8% respectively. No significant loss of FVIII:C after reconstitution was noticed after 24 h of storage at room temperature either in the non-heated or heated product (data not shown). FVIII:Ag values were always higher than FVIII:C and decreased to a lesser extent during heat treatment. The FVIII:Ag/FVIII:C ratio values ranged from 1.46 to 1.79 before heating and from 1.5 to 2.13 after heating. vWf:Ag and ristocetin cofactor activity values were always higher than FVIII values. Heat treatment induced a mean loss of 18.6 and 24% respectively, of vWf:Ag and ristocetin cofactor activity. The vWf:Ag/ris-

Fig. 1. Analysis of vWf multimeric distribution in unheated (UH) and corresponding heated (H) FVIII concentrate. Samples from two different batches (FVIII, 1 and FVIII, 2) taken before and after heating together with samples of normal plasma (NP) and cryoprecipitate (Cryo) were tested in the same electrophoretic run in SDS 2.5% agarose. The conditions and numbering of vWf bands are as described previously [9]. In the autoradiography (a) obtained after overlay with ¹²⁵I-labelled anti-vWf rabbit antibodies, arrow indicates deposit line, the cathode is at the top. b Scans corresponding to a; unheated FVIII concentrates are in dotted lines, the cathode is on the left.



tocetin cofactor activity ratio ranged from 2.5 to 3.2 before heat treatment and remained almost constant during heating.

Analysis of vWf multimers of unheated and heated FVIII concentrate from 5 batches, comparatively to plasma and cryoprecipitate, was performed by SDS-agarose electrophoresis. Changes induced by heat treatment were particularly evident in 2 batches. Their patterns are shown in figure 1. In plasma and cryoprecipitate, vWf displayed the pattern already described [9]. Unheated concentrates displayed a different kind of pattern, with (a) clear bands ahead of the band numbered 1 (the fastest

migrating predominant band in plasma); (b) intervening bands, especially those named 'a', migrating ahead of corresponding predominant band in plasma, with increased intensity; (c) absence or decrease in larger forms, and (d) similar intensity of radioactivity associated with each multimeric unit composed mainly of two predominant bands: one migrating like predominant bands in plasma, the other like minor plasma bands named 'a'. In corresponding heated concentrates tested at the same protein concentration, the pattern was somewhat different: the intensity associated with low molecular weight multimers was lower. Furthermore, bands were much

Table II. Comparative effect of heated and unheated FVIII concentrate on platelet adhesion to human collagen (results of 3 separate experiments with the same batch of FVIII concentrate)

Perfusate: 40% washed red cells $2 \times 10^{11}/l$ ^{111}In -platelets 60% solution made of	Number of deposited platelets ^a $\times 10^5/cm^2$		
Normal plasma 1 U vWf:Ag/ml	17.9 ± 5.7 n = 2 (100%)	17.6 ± 5.7 n = 2 (100%)	24.7 ± 0.8 n = 2 (100%)
4% HSA	1.3 ± 0.15 n = 2 (0%)	2 ± 0.4 n = 2 (0%)	2.2 ± 0.4 n = 2 (0%)
Unheated FVIII concentrate diluted in HSA 1.66 U vWf:Ag/ml	8.3 ± 1.2 n = 3 (42%)	9.1 ± 3.2 n = 3 (45%)	10.6 ± 1.7 n = 2 (37%)
Heated FVIII concentrate diluted in HSA 1.76 U vWf:Ag/ml	18.4 ± 2.6 n = 2 (103%)	17.8 ± 5 n = 3 (101%)	17.7 ± 3.9 n = 2 (69%)

^a Number of platelets deposited given as mean \pm SD; n = number of perfusion runs; the percentage of platelet adhesion is given in parentheses.

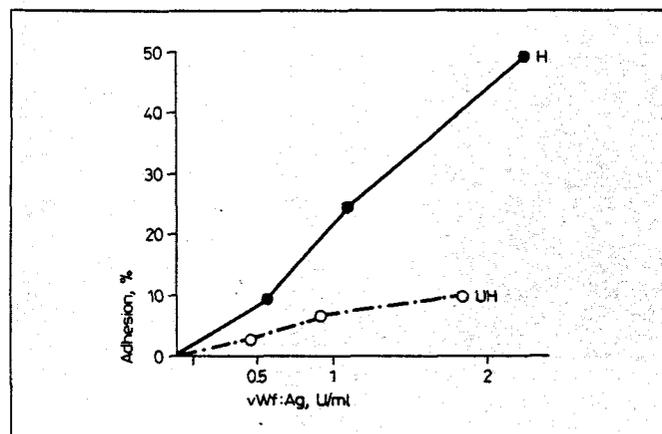


Fig. 2. Platelet adhesion values (mean of the percentages obtained in 3 perfusion runs) for unheated (UH) and corresponding heated (H) FVIII concentrate tested at various concentrations expressed in vWf:Ag units per millilitre of solution included in the perfusate. The batch used is different from the one analysed in the experiments summarised in table II.

more difficult to distinguish and the radioactivity was higher in the area corresponding to large multimers; the radioactivity distribution thus obtained tends to be more comparable with that displayed by plasma and cryoprecipitate.

The results of the comparison of platelet adhesion to collagen mediated by unheated and corresponding heated FVIII concentrate are summarised in table II. The platelet deposition mediated by dialysed concentrate was constantly higher after heating. In two experiments, platelet deposition obtained with the heated product (1.7 U vWf:Ag/ml) was similar to that measured with a normal plasma (1 U vWf:Ag/ml). Microscopic analysis of coverslips coloured with May Grünwald-Giemsa has shown that this increase in platelet deposition was related to an increase in the number of adherent platelets and not to an increase in platelet aggregates. Further experiments made with increasing amounts of another batch of FVIII concentrate have shown that the heated product induced the same platelet adhesion as 3 times the quantity of unheated product (fig. 2).

In vivo Evaluation

Patients with Haemophilia A. In vivo recovery was calculated from an expected plasma FVIII:C level based on a plasma volume of 40 ml/kg b.w. For the 3 patients with severe haemophilia, recovery of FVIII:C was 153, 144 and 107%, respectively. For the patient with moderate haemophilia, recovery was 93%. The values were not corrected for the haematocrit, except for the patient with moderate haemophilia. FVIII biological half-life calculated during the second phase of FVIII:C decay gave the following values: 20, 17.5, 17 and 13.5 h.

Patients with vWD. The data obtained after infusion of heated FVIII concentrate into 3 patients not treated 2 weeks before the evaluation are summarised in table III. C.M. and D.C. are patients with respectively severe and moderate form of type-I vWD; Z.A. is a patient with a variant form of vWD type IIA [10]. Infusion of concentrates caused an increment in plasma FVIII:C of about 0.58–0.80 IU/ml, an amount consistent with the expected values after doses of 25–31 IU/kg b.w. In contrast to the values obtained in haemophilic patients, a sustained elevated FVIII:C level was noticed for several hours after infusion. Duke's bleeding time (normal values: 4 min) was shortened in all 3 patients and was normalised in 2 of them, while their ristocetin cofactor activity levels were ≥ 0.48 IU/ml. D.C.'s bleeding times were measured in parallel by a more sensitive method (normal values < 9 min); shortening from > 20 to 12 min but no complete correction was then noticed. Recovery and half-life of functional vWf calculated on the basis of ristocetin cofactor activity values of the different plasma samples from D.C. were 60% and 17 h, respectively.

Heat-treated concentrate was also infused in one other

Table III. Bleeding time and FVIII/vWf values in vWD patients following a single infusion of heat-treated FVIII concentrate

	Bleeding time ^a min	FVIII:C U/dl	FVIII:Ag U/dl	vWf:Ag U/dl	Ristocetin cofactor activity U/dl
<i>Patient C. M.</i>					
Before infusion	>30	2	12	0	<1
After infusion					
1 h	14	60	76.5	112	32
3 h	5	50	75.5	88	30
6 h	16	70	68	56	20
<i>Patient D. C.</i>					
Before infusion	7	12	5	18	12
After infusion					
1 h	2.30	84	79	180	75
3 h	3	64	53	124	56
6 h	3	58	52	87	48
24 h	-	50	48	42	28
48 h	-	35	37	25	18
<i>Patient Z. A.</i>					
Before infusion	>30	130	67.5	70	8
After infusion					
1 h	6.30	210	149.5	186	36
3 h	4	180	121	178	50

^a Duke, normal values <4 min.

patient with type IIA vWD who was being treated with cryoprecipitate for haemothorax. One hour after the infusion of 30 IU FVIII:C/kg b.w., his bleeding time (Duke) was shortened from 30 to 6 min. Consequently, in order to evacuate a 1-litre haematoma, thoracotomy was performed under heat-treated FVIII concentrate (initially 3×40 IU FVIII:C/kg b.w. per day, then from day 7 to 13: 3×30 IU FVIII:C/kg b.w.). No bleeding occurred during operative and post-operative periods.

Discussion

FVIII concentrates are the treatment of choice in haemophilia A. FVIII in vitro (FVIII:C value, stability) and in vivo evaluations in haemophilia recipients (recovery and biological half-life) are essential to assess the efficacy of these products. However, as most purification procedures start from cryoprecipitate obtained from large pools of plasma, the risk of possible contamination with an infectious virus poses a serious problem of safety. As heat treatment has been introduced worldwide as one of the ways of reducing the risk of AIDS transmission, we

have submitted our FVIII concentrate to a heating procedure previously shown to inactivate LAV virus [L. Montagnier, pers. communication].

The dry heat treatment of our intermediate-purity concentrate for 96 h at 68 °C appeared to have little effect on FVIII. The average loss of FVIII:C is within acceptable limits and may be related to the stabilising effect of lysine and contaminating proteins. There is a good correlation between the data obtained by one-stage and two-stage assays and a good stability of FVIII:C in reconstituted heated concentrate which excludes FVIII activation during thermal virus inactivation. Furthermore, the drop of only 8.6% in the FVIII:Ag indicates that there is no important change in the epitopes detected by anti-FVIII antibodies, during heating. In vivo evaluation of heated FVIII concentrate in haemophilia A patients confirmed its circulatory recovery (>90%) and survival (half-life: 13–20 h). These results are identical to those obtained previously with unheated product and are satisfactory. They indicate that, apart from a lower specific activity related to the loss of FVIII:C activity and a somewhat lower solubility, our heated concentrate is just as suitable as unheated product for the treatment of haemophilia A.

Moreover, since October 1985 10.3 million FVIII:C units of our heated product have been supplied to treat haemophilia A patients without a single complaint about its coagulant activity.

The purpose of substitutive product in the treatment of vWD is to correct both coagulation and primary haemostasis by normalising functional FVIII and vWf. Before the occurrence of the AIDS problem, the use of cryoprecipitate to achieve correct Duke bleeding time and control the haemorrhagic problems of most patients was the most commonly used replacement therapy in vWD. Given that cryoprecipitate does not readily tolerate heat treatment and that there is considerable variability in the bleeding time correcting ability of different cryoprecipitates from single donor units, this product no longer combines reproducible efficacy with safety.

Although they generally contain considerable amounts of vWf:Ag and sometimes a high level of ristocetin cofactor [11], most intermediate and high-purity FVIII concentrates are unsuitable in vWD. Their failure to correct bleeding time in vWD patients [12] reflected by their inability to induce platelet adhesion to subendothelium [13] is generally thought to be related to their lack of high molecular weight forms of vWf. However, Köhler et al. [14] have reported high ristocetin cofactor potency and a high ristocetin cofactor activity/vWf:Ag ratio together with a shortening of bleeding time in vWD patients treated with two commercial heat-treated concentrates. It was for this reason that we carried out an *in vitro* and *in vivo* evaluation of the effect of heating on vWf present in our concentrate. Our product contains high levels of vWf:Ag and ristocetin cofactor activity. During heating, we noticed decreases in vWf:Ag and ristocetin cofactor activity, but no significant change in the ratio of these two parameters. However, SDS-agarose analysis has shown that heating induces a change in the multimeric distribution of vWf. There is a decrease in low molecular weight forms of vWf, an increase in high molecular weight forms of vWf and sometimes an appearance of larger vWf forms after heating. Furthermore, platelet adhesion assays have shown clearly that, although variations are noticed from batch to batch, heated FVIII concentrate achieves better platelet adhesion to collagen than the corresponding unheated product. Furthermore, *in vivo* evaluation in vWD patients has shown a correction or at least a significant shortening of bleeding time after infusion of heat-treated products. Moreover, a vWD patient underwent thoracotomy under heat-treated FVIII concentrate cover without any bleeding problems. These results indicate that the heated FVIII concentrate prepared by CRTS Lille

is useful for the management of patients with vWD. However, its clinical efficacy depends upon the severity and type of the disease and the localisation and extent of the haemorrhage.

The biological activity of vWf has been shown to be primarily related to its larger multimers [15, 16]. Thus, on a molecular basis, it may be conceivable that the heating of our concentrate, by increasing high molecular weight vWf forms, promotes platelet adhesion, thereby explaining its efficacy in vWD patients. However, such an effect is probably dependent upon the nature of vWf forms present in concentrates before heat treatment and on the extent of heating. Consequently, a precise *in vitro* and *in vivo* evaluation of vWf is required for every product before establishing efficacy in vWD.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. J. Goudemand (Centre Hospitalier Régional, Lille) for her collaboration in the study of a vWD patient. We thank Mr G. Dupont for his technical assistance and Mrs B. Wittouck for typing this manuscript.

References

- Allain, J.P.: Principles of *in vivo* recovery and survival studies. *Scand. J. Haematol.* 41: suppl, pp. 123-145 (1984).
- Soulier, J.P.; Larrieu, M.J.: Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des facteurs antihémophiliques A et B. *Sang* 24: 205-215 (1953).
- Biggs, R.; Eveling, J.; Richards, G.: The assay of antihemophilic globulin activity. *Br. J. Haemat.* 1: 20 (1955).
- 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. *Br. J. Haemat.* 47: 269-282 (1981).
- 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.* 25: suppl., pp. 18-24 (1977).
- Weiss, H.; Hoyer, L.; Rickles, F.; 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.* 52: 2708-2716 (1973).
- Sakariassen, K.; Aarts, P.; Groot, P. de; Houdijk, W.; Sixma, J.: A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix and purified components. *J. Lab. clin. Med.* 102: 522-535 (1983).
- Chandrarajan, J.: Separation of type III collagen from type I collagen and pepsin by differential denaturation and renaturation. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 83: 180-186 (1978).

- 9 Mazurier, C.; Samor, B.; Goudemand, M.: Improved characterization of plasma von Willebrand factor heterogeneity when using 2.5% agarose gel electrophoresis. *Thromb. Haemostasis* 55: 61-64 (1986).
- 10 Nilsson, I.: Von Willebrand's disease from 1926-1983. *Scand. J. Haematol.* 40: suppl., pp. 21-43 (1984).
- 11 Allain, J.P.; Verroust, F.; Soulier, J.P.: In vitro and in vivo characterization of factor VIII preparations. *Vox Sang.* 38: 68-85 (1980).
- 12 Blatt, P.; Brinkhous, K.; Culp, H.; Krauss, J.; Roberts, H.: Anti-hemophilic factor concentrate therapy in von Willebrand disease. Dissociating of bleeding-time factor and ristocetin-cofactor activities. *J. Am. med. Ass.* 236: 2770-2772 (1976).
- 13 Sixma, J.; Sakariassen, K.; Beeser-Visser, N.; Ottenhof-Rovers, M.; Bolhuis, P.: Adhesion of platelets to human artery subendothelium: effect of factor VIII-related von Willebrand factor of various multimeric composition. *Blood* 63: 128-139 (1984).
- 14 Köhler, M.; Hellstern, P.; Wenzel, E.: The use of heat-treated factor VIII concentrates in von Willebrand's disease. *Blut* 50: 25-27 (1985).
- 15 Meyer, D.; Obert, B.; Lavergne, J.M.; Zimmerman, T.: Multimeric structure of factor VIII/von Willebrand factor in von Willebrand's disease. *J. Lab. clin. Med.* 95: 590-602 (1980).
- 16 Weinstein, M.; Deykin, D.: Comparison of factor VIII-related von Willebrand factor proteins prepared from human cryoprecipitate and factor VIII concentrate. *Blood* 53: 1095-1105 (1979).

Received: July 15, 1986

Revised manuscript received: October 28, 1986

Accepted: October 30, 1986

Claudine Mazurier, MD,
Laboratoire d'Hémostase C,
Centre Régional de Transfusion Sanguine,
21 rue Camille Guérin,
F-59012 Lille Cedex (France)

L'étude du vWF a montré que le chauffage induit une certaine diminution du vWF:Ag et du cofacteur de la ristocétine alors que l'on observe une augmentation des HPM du vWF associée à une augmentation de la correction de l'adhésion plaquettaire.

Ces concentrés peuvent donc être utilisés dans le traitement de la vWD et les résultats obtenus "in vivo" confirment leur efficacité thérapeutique.

B. TRAVAUX COMPLEMENTAIRES : COMPARAISON DE DIFFERENTS LOTS DE CONCENTRES, CHAUFFES OU TRAITES PAR SOLVANT-DETERGENT :

Ces travaux ultérieurs ont permis d'étudier la capacité à induire l'adhésion plaquettaire au collagène de différents concentrés de FVIII dont certains ont été traités par le chauffage, et d'autres par solvant détergent. Nous avons ainsi pu faire une étude comparative de ces deux produits.

1) Methode et Expression des résultats :

- la fibronectine (Fn) est dosée par néphélémétrie
- le fibrinogène (Fg) est déterminé par immunodiffusion radiale
- le pourcentage de HPM a été calculé suivant la méthode explicitée page 56
- le "50 % d'adhésion" représente le nombre d'unités de vWF:Ag par ml de plasma nécessaires pour obtenir 50 % d'adhésion plaquettaire sachant que 100 % est la valeur obtenue avec le plasma normal et 0 % la valeur correspondant au plasma de vWD.

Dans certains cas (●) où une seule concentration de vWF:Ag a été testée, nous avons dû faire une extrapolation pour calculer ce 50 % d'adhésion : Dans un premier temps, nous avons tracé une droite entre le point donné par notre valeur, et le point (0.0) à l'origine. A partir de cette droite, nous avons fait une première estimation (A) du 50 % d'adhésion. Dans un deuxième temps, nous avons calculé l'équation de la droite obtenue avec un concentré de FVIII testé à plusieurs concentrations. Puis à partir de cette équation, nous avons fait notre deuxième estimation (B) du 50 % d'adhésion. La moyenne des deux valeurs obtenues (A et B) correspond à la valeur exprimée dans les tableaux.

2) Matériel :

- le plasma normal (PN) est un mélange d'au moins 20 plasmas normaux citratés
- le cryoprécipité thérapeutique (CP) est obtenu par cryoprécipitation du plasma de 10 donneurs au maximum. Il est conservé par congélation
- le matériel de départ (SM) est un cryoprécipité en pâte provenant de plus de 1 000 poches de plasma et conservé par congélation. Lorsque le plasma de ces poches est décongelé partiellement, mélangé puis centrifugé, la pâte de cryoprécipitation est dite "industrielle". Par contre, lorsque le plasma de chaque poche est cryoprécipité individuellement, le mélange des différents cryoprécipités obtenu est appelé pâte de cryoprécipité "feuille".
- les concentrés de FVIII sont des produits thérapeutiques provenant de la pâte de cryoprécipité (SM) obtenue, en général, par la méthode industrielle. Les principales étapes de préparation sont décrites ci-dessous :

Préparation Super VIII chauffé

- Lavage pâte de cryoprécipité par alcool froid à 8 % pour éliminer des protéines contaminantes
- Remise en solution de la pâte dans tampon tris à 24 °C en présence d'héparine
- Adsorption des facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K par addition de gel d'alumine
- Précipitation au froid à 10 °C pour éliminer une partie du fibrinogène et de la fibronectine
- Addition de stabilisants dans la solution de Facteur VIII (citrates trisodique - NaCl)
- Concentration du produit sur cassettes d'ultrafiltration
- Filtration stérilisante
- Répartition en flacons 50 ml
- Lyophilisation
- Chauffage à sec 96 Heures à 68°C

Préparation Super VIII SD

- Mise en solution de la pâte de cryoprécipité
- Addition de gel d'alumine pour adsorber les facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K.

- Elimination du fibrinogène et fibronectine par un procédé plus efficace que dans le cas du super VIII chauffé, ce qui induit un taux de protéines plus bas et une meilleure activité spécifique
- Inactivation virale par traitement TNBP-cholate
- Elimination du solvant-détergent par gel filtration sur DEAE Sépharose G25
- Concentration du produit par ultracentrifugation
- Filtration stérilisante
- Répartition en flacons 50 ml
- Lyophilisation

RESULTATS

1) Evaluation "in vitro"

Les tableaux VIII, IX, X regroupent les principales caractéristiques du plasma normal, du matériel de départ utilisé dans la préparation des concentrés thérapeutiques, et des différents concentrés de FVIII "inactivés". Ils montrent la différence d'activité spécifique entre cryoprécipités et concentrés de FVIII, les protéines contaminantes étant essentiellement le fibrinogène, la fibronectine et l'albumine.

Le rapport vWF:Ag/cofacteur de la ristocétine est voisin de 2 pour le cryoprécipité thérapeutique comme pour les concentrés de FVIII chauffés ou SD.

Le pourcentage de HPM du vWF des concentrés chauffés est important puisqu'il se situe entre la valeur du plasma normal (60 %) et celle du cryoprécipité thérapeutique (50 %). Par contre, les concentrés de FVIII SD ont un pourcentage de HPM du vWF moins important puisque la moyenne est d'environ 35 %.

En ce qui concerne l'adhésion plaquettaire (Fig. 25), on voit que le plasma normal, le cryoprécipité thérapeutique et le matériel de départ des concentrés de FVIII ont une capacité similaire à corriger l'adhésion des plaquettes au collagène puisque environ 0.38 U de vWF:Ag/ml induisent 50 % d'adhésion (Tableau VIII). Tous les concentrés chauffés sont capables d'induire 50 % d'adhésion avec moins de 2 U de vWF:Ag/ml (Tableau IX). Par contre, les SVIII SD apparaissent moins efficaces dans l'adhésion. En effet, moins de la moitié des lots testés (5 sur 11) sont capables d'induire 50 % d'adhésion avec moins de 2 U/ml de vWF:Ag.

	Protéines mg/ml	vWF:Ag U/ml (U/mg)	RistoCof U/ml (U/mg)	Fibrinogène mg/ml	Fibronectine mg/ml	adhésion * (50 %) U/ml	% HPM **
Plasma Normal NP	75	1 (0.013)	1 (0.013)	2.2	0.39	0.39	5
Matériel Départ SM	92	16 (0.17)	11 (0.12)	57.5	5.82	0.38	51
Cryo Précipité CP	21	10 (0.48)	5 (0.24)	7	1.46	0.38	52

Tableau VIII: Principales caractéristiques du plasma normal, du matériel de départ utilisé dans la préparation des concentrés de FVIII et du cryoprécipité thérapeutique

* Nombre d'unités par ml de vWF:Ag nécessaire pour induire 50 % d'adhésion plaquettaire

** Pourcentage des HPM du vWF (voir p. 56)

Concentrés chauffés	Protéines mg/ml	vWF:Ag U/ml (U/mg)	Risto Cof U/ml (U/mg)	Fibrinogène mg/ml	Fibronectine mg/ml	Adhésion * (50 %) U/ml	HMW ** %
885 F05 C 1	46	41 (0.89)	20 (0.43)	26	5.95	0.76	61
80 61020 C 2	45	61 (1.35)	13 (0.29)	13	6.2	1.76	50
80 61020 C 3	-	88 (-)	-	-	-	0.92	60
80 60410 C 4	51	98.8 (1.94)	34.8 (0.68)	-	-	1.95	49

Tableau IX : Principales caractéristiques des concentrés de FVIII chauffés

* Nombre d'unités par ml de vWF:Ag nécessaires pour induire 50 % d'adhésion plaquettaire (voir p. 53)

** % de HPM du vWF (voir p. 56)

Concentrés SD	Protéines mg/ml	vWF:Ag U/ml (U/mg)	Risto Cof U/ml (U/mg)	Fibrinogène mg/ml	Fibronectine mg/ml	Adhésion * (50 %) U/ml	HMW ** 5 %
270 130 SD 1	41	89 (2.17)	54 (1.31)	7.35	3.1	0.94•	38.5
270 140 SD 2	52	82.5 (1.59)	30 (0.58)	11.2	5	0.89•	45.6
160 131 SD 3	36	50 (1.39)	27 (0.75)	7	3.86	0.82	40
160 140 SD 4	32	77 (2.4)	25 (0.78)	10	3.36	> 2	20
170 180 SD 5	31	104 (3.35)	63 (2.03)	9.7	3.9	> 2	30.4
170 230 SD 6	34	104 (3.05)	60 (1.76)	10.3	5	> 2	37.7
170 250 SD 7	34	55 (1.62)	24 (0.7)	14	5.11	> 2	22
170 420 SD 8	38	80 (2.1)	53 (1.39)	11.2	6.3	1.32•	39.7
170 500 SD 9	36	94 (2.6)	66 (1.83)	11	6	> 2	36.3
170 840 SD 10	43.5	103 (2.36)	47 (1.08)	14	5.5	> 2	37.5
170 850 SD 11	40.5	92 (2.27)	34 (0.84)	11.7	4.7	1.4•	35.9

Série 2

Série 1

Tableau X : Principales caractéristiques des concentrés de FVIII traités au solvant-détergent (SD)
 * Nombre d'unités par ml de vWF:Ag nécessaires à induire 50 % d'adhésion plaquettaire
 • Pourcentage des HPM du vWF (voir p.56)

• cft. p. 133

graphe :

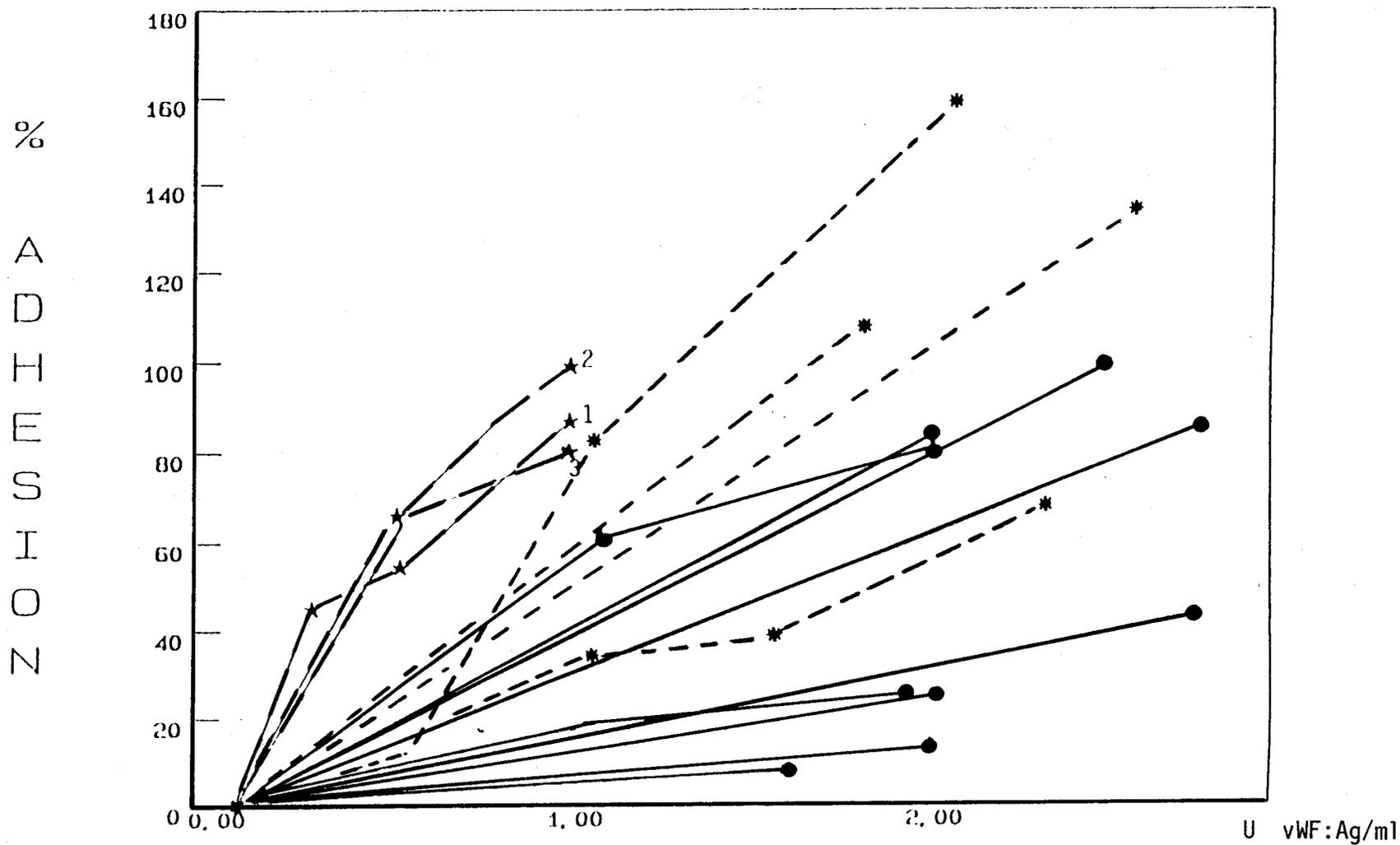


Figure 25 : Adhésion des plaquettes au collagène I, III non fibrillaire en présence de :

- ★ [1 matériel de départ
2 plasma normal
3 cryoprécipité thérapeutique
- * - concentré de facteur VIII chauffé
- - concentré de facteur VIII SD

On peut remarquer que dans la série des concentrés SD (Tableau X), on distingue les concentrés préparés à partir d'une pâte de cryoprécipité dite industrielle (série 1) de ceux préparés à partir d'une pâte de cryoprécipité dite feuille : série 2. Seulement le 1/3 des concentrés de la série 1 corrigent l'adhésion des plaquettes au collagène avec moins de 2 U de vWF:Ag/ml (SD 3, SD 8, SD 11). Par contre, les 2 lots testés de la série 2 (lot 1 et 2) corrigent l'adhésion plaquettaire avec moins de 1 U de vWF:Ag/ml (Tableau IX).

Devant la différence des résultats obtenus avec les 2 types de concentrés, chauffés et SD, il nous a paru intéressant de déterminer si la moindre qualité des concentrés SD était en relation avec le protocole de préparation ou le traitement chimique. Aussi, nous avons étudié la capacité à induire l'adhésion des plaquettes au collagène, du produit en cours de fabrication avant et après traitement au TNBP. Il semble (Tableau XI) que le traitement au TNBP de deux échantillons de produit en cours de fabrication (A et B) que nous avons testés ne provoque pas de modifications de leur capacité à induire l'adhésion plaquettaire. Ces deux lots sont cependant différents puisque l'un (A) induit 50 % d'adhésion à une concentration de 2.38 U vWF:Ag/ml alors que l'autre (B) induit environ 100 % d'adhésion pour une concentration légèrement inférieure.

Les premiers résultats obtenus en comparant le profil multimérique de l'échantillon A avant et après le traitement au TNBP montre qu'il n'y a pas de modification du pourcentage de HPM du vWF. Cependant, des études faites après conservation à - 20 °C pendant 3 mois des mêmes échantillons A montre que le produit en cours de fabrication non traité au TNBP garde les mêmes capacités à induire l'adhésion (Tableau XI) et une structure multimérique semblable à celle du plasma normal, alors que le produit en cours de fabrication traité au TNBP est incapable d'induire une adhésion plaquettaire (0 % à 2 U vWF:Ag/ml) et n'a plus aucun HPM du vWF (Fig. 26).

2) Etude "in vivo" :

Une étude "in vivo" a été réalisée en collectant les résultats obtenus chez 5 malades atteints de vWD qui ont été traités par des concentrés de FVIII SD de la série 1. Le temps de saignement (TS) de ces malades est en général supérieur à la normale (Technique de Duke : Normale < 5 min). Après injection du concentré SD3, le TS du patient D.C.

	% Adhésion plaquettaire	
	Avant TNBP	Après TNBP
Pâte de cryoprécipité A (2.38 U vWF:Ag/ml)	51 ± 4.58	51 ± 9.8
Pâte de cryoprécipité A conservée 3 mois à -20 °C (2.38 U vWF:Ag/ml)	47.2 ± 6.6	0
Pâte de cryoprécipité B (2 U vWF:Ag/ml)	98 ± 12	79 ± 16

Tableau XI : Pourcentage d'adhésion plaquettaire obtenu avec deux lots de pâte de cryoprécipité avant et après traitement au TNBP



Figure 26 : Electrophorèse en SDS-agarose du produit en cours de fabrication traité au solvant-détergent (1) ou non traité au solvant-détergent (2) après conservation 3 mois à - 20°C.

passé de 5 à 3 minutes et ce durant 6 heures après injection. De même, après injection du concentré SD 8 le TS du patient D.J qui était supérieur à 15 min est raccourci à 6 min 30 pendant 5 heures. Ainsi, l'injection de ces deux lots de concentré SD apparaît efficace. Par contre, les injections des concentrés SD 5 et du SD 9 respectivement aux patients C.L. et D.P. ne modifient pas leur TS qui reste supérieur à 15 min. Nous avons également constaté que l'injection du concentré SD 6 au patient D.P n'a pas été cliniquement satisfaisante car elle n'a pas réussi à stopper son hémorragie dentaire.

Des études antérieures faites avec des concentrés chauffés ont montré que l'injection de concentrés chauffés raccourcissait le TS (Duke) de la 1ère à la 3ème heure après injection. Cependant, les TS ne sont pas toujours normalisés.

DISCUSSION

La première étude que nous avons faite sur les concentrés de FVIII montre que le chauffage (96 h à 68 °C) a un effet favorable sur le vWF. Les différents lots de concentrés de FVIII chauffés que nous avons étudiés sont tous capables d'induire 50 % d'adhésion plaquettaire avec moins de 2 U de vWF:Ag/ml et ont un pourcentage de HPM du vWF semblable à la pâte de cryoprécipité de départ. Notre étude, cependant, n'a porté que sur 4 lots différents puisque le traitement par chauffage qui n'inactive pas le virus de l'hépatite non-A non-B a vite été supplanté par le traitement au solvant détergent qui, lui, inactive beaucoup plus le virus de l'hépatite non-A non-B. Ainsi, il n'a pas été possible, vu la courte période de cession de ce produit d'effectuer de nombreuses études "in vivo". Cependant, d'après les quelques résultats des études faites chez les vWD, il semble que les concentrés de FVIII chauffés étaient efficaces chez ces malades.

Les concentrés de FVIII SD obtenus à partir de la méthode d'inactivation virale par solvant détergent ont une activité spécifique supérieure aux concentrés chauffés. Ils sont cependant moins aptes à corriger l'adhésion des plaquettes au collagène, ont moins de HPM du vWF et apparaissent moins efficaces dans le traitement de la vWD.

Les différences observées dans les propriétés d'adhésion plaquettaire entre les lots de la série 1 et ceux de la série 2 laissent penser que la faible capacité à induire l'adhésion plaquettaire des concentrés de FVIII de la série 1 est liée à la qualité de la pâte de cryoprécipité et non au traitement par le TNBP. Néanmoins, ces résultats

doivent être vérifiés sur un nombre de concentrés de la série 2 au moins équivalent à celui de la série 1. De plus, il sera nécessaire de comparer les propriétés adhésives des pâtes de cryoprécipité elles-mêmes.

Nous avons montré que le vWF du produit en cours de fabrication traité au TNBP avait la même capacité à induire l'adhésion plaquettaire et la même structure multimérique que le vWF du produit en cours de fabrication avant traitement au TNBP. Ces résultats tendent à montrer que le traitement au TNBP n'est pas responsable de la perte d'activité du vWF. Cependant, la disparition des HPM du vWF et la perte des capacités d'adhésion après conservation à - 20 °C du produit en cours de fabrication traité au TNBP laissent suspecter un défaut de stabilité du vWF.

Il est possible que le TNBP retire ou dénature un composé plasmatique nécessaire à la stabilisation du vWF et qu'ainsi les étapes ultérieures de préparation des concentrés SD dont la lyophilisation favorisent cette perte d'activité du vWF. Il sera donc nécessaire, après avoir renouvelé des comparaisons sur la conservation du vWF dans des produits traités ou non au TNBP, d'étudier l'effet de la lyophilisation sur le vWF.

L'interprétation des différentes méthodes d'étude du vWF montre que l'activité cofacteur de la ristocétine n'est pas un bon indicateur de l'activité biologique du vWF puisque, bien qu'elle semble parfois corrélée au pourcentage de HPM du vWF, elle n'est pas corrélée à l'adhésion plaquettaire ni aux résultats obtenus "in vivo". Ainsi le concentré SD 5 qui a un cofacteur de la ristocétine relativement élevé (2.03 U/mg) ne corrige ni l'adhésion plaquettaire, ni le TS in vivo.

En ce qui concerne le pourcentage de HPM du vWF, on voit que sur les 5 lots qui induisent 50 % d'adhésion plaquettaire avec moins de 2 U de vWF:Ag/ml, 4 ont un pourcentage de HPM supérieur à 38 %, alors que les 6 lots qui ne peuvent induire 50 % d'adhésion plaquettaire à 2 U de vWF:Ag/ml ont tous un pourcentage de HPM du vWF inférieur à 38 %. Parmi les 5 qui corrigent l'adhésion plaquettaire, bien que les différences soient peu significatives, on remarque que les concentrés SD 3 et SD 2 qui ont la meilleure capacité à corriger l'adhésion plaquettaire, ont également les pourcentages les plus élevés de HPM du vWF et que le concentré SD 11 qui est le moins apte à corriger l'adhésion, a le pourcentage de HPM du vWF le moins élevé. De même, tous les concentrés chauffés ont un pourcentage de HPM supérieur à 49 % et induisent 50 % d'adhésion plaquettaire à moins de 2 U de vWF:Ag/ml. De plus, on voit que les deux concentrés qui ont respectivement

60 et 61 % de HPM du vWF, corrigent mieux l'adhésion plaquettaire que ceux qui ont 49 et 50 % de HPM du vWF. L'ensemble de ces résultats montre que la présence de HPM du vWF pourrait être un indicateur d'une bonne conservation du vWF et que de ce fait, elle est souvent corrélée à l'activité du vWF dans l'adhésion plaquettaire. Cependant, il s'avère délicat de prévoir l'efficacité d'un concentré thérapeutique par la simple analyse des multimères du vWF car il n'existe pas de corrélation évidente entre les 2 paramètres.

La capacité de différents concentrés de FVIII à induire l'adhésion des plaquettes au collagène semble, elle, être nécessaire pour corriger le temps de saignement "in vivo".

En effet, sur 5 patients vWD traités par des concentrés de FVIII SD, seuls les 2 patients (D.C. et D.J.) qui ont reçu des concentrés (respectivement SD 3 et SD 8) capables d'induire 50 % d'adhésion avec moins de 2 U de vWF:Ag/ml ont eu soit une normalisation (D.C.) soit une forte diminution (D.J.) de leur temps de saignement. Chez les 3 autres patients traités avec des concentrés incapables d'induire 50 % d'adhésion avec moins de 2 U de vWF:Ag/ml, il n'a été observé aucune correction du temps de saignement. Néanmoins, la technique de perfusion requise pour quantifier la capacité d'induire l'adhésion plaquettaire est une technique longue, délicate, nécessitant un grand volume de sang frais et peut donc difficilement être appliquée à un contrôle de qualité des différents lots de concentrés de FVIII. Par contre, elle nous semble particulièrement bien adaptée à une évaluation de divers produits obtenus par des procédés différents.

DISCUSSION GENERALE

Depuis de nombreuses années, le "Laboratoire de Recherche sur l'Hémostase du C.R.T.S de Lille" a orienté ses travaux sur l'étude de la structure et du rôle physiologique du complexe FVIII/vWF. C'est ainsi qu'en collaboration avec le laboratoire de Biochimie de l'Université des Sciences de Lille I (Prof. J. Montreuil, LA CNRS 217), il s'est particulièrement attaché à préciser la composition et la structure des glycanes du vWF (Samor et al., 1982, Samor et al., 1986, Samor et al., 1987). En outre, il a abordé le problème du rôle de ces glycanes et a montré notamment que le vWF dépourvu d'acide sialique et d'une partie de ses résidus galactose, se fixait moins bien aux plaquettes, en présence de ristocétine, que le vWF natif (Goudemand et al., 1985). Néanmoins, la fixation aux plaquettes, dans ces conditions non physiologiques, n'est qu'une facette de l'activité biologique du vWF et, tout comme l'activité cofacteur de la ristocétine, ne peut être assimilée à l'ensemble des fonctions que le vWF remplit, tant au niveau de l'interaction plaquette/sous endothélium qu'au niveau interaction plaquette/plaquette, dans le processus de l'hémostase primaire. C'est pourquoi il est apparu indispensable de recourir aux techniques de perfusion "in vitro" qui, dépendantes du vWF, respectent les conditions de la circulation sanguine. Ces techniques sont en effet, à l'heure actuelle, considérées comme un des meilleurs modèles expérimentaux pour l'étude de l'adhésion plaquettaire (Baumgartner et al. 1972, Sakariassen et al. 1983).

Notre première tâche a donc consisté à adapter ces techniques au laboratoire afin de pouvoir disposer d'un système d'étude des fonctions du facteur Willebrand se rapprochant des conditions physiologiques.

Après un stage dans le laboratoire du Professeur Sixma, à Utrecht, qui à l'époque était l'un des seuls laboratoires avec celui du Professeur Baumgartner à Bâle, à maîtriser parfaitement les techniques d'étude de l'adhésion plaquettaire, nous nous sommes efforcés, avec les deux chambres de perfusion l'une annulaire, permettant l'étude de l'adhésion au sous-endothélium, et l'autre rectangulaire pour l'étude de l'adhésion au

collagène, à reproduire les expérimentations montrant le rôle du vWF dans l'adhésion plaquettaire mesurée pour ces deux systèmes. Nous avons ainsi vérifié, en nous basant sur le nombre de plaquettes fixées au cours de perfusion de cinq minutes à des vitesses de cisaillement supérieures à 500 sec^{-1} , qu'il existe un défaut de fixation aux constituants du sous endothélium des plaquettes radiomarquées lorsque le perfusat est dépourvu de vWF. Ce défaut est, conformément à la littérature, et consécutivement à la présence de vWF au niveau du sous endothélium, beaucoup plus important en chambre rectangulaire où la fixation se fait sur du collagène, qu'en chambre annulaire, où c'est le sous-endothélium qui est utilisé. La fixation des plaquettes est rétablie par adjonction de nos préparations de vWF purifié, ce qui permet d'utiliser cette technique pour mesurer l'activité fonctionnelle de diverses préparations de vWF.

Après ces mises au point préalables, nous avons ainsi abordé le problème du rôle des glycanes du vWF. Pour ce, nous avons étudié l'effet de diverses exoglycosidases sur le vWF. En prenant soin de travailler en présence d'inhibiteurs de protéases, la partie glycanique du vWF ayant été démontrée jouer un rôle protecteur vis-à-vis de son intégrité multimérique (Federici et al., 1987 a), nous avons montré, en collaboration avec l'équipe de Federici (Milan) et celle du Professeur Sixma, que l'adhésion plaquettaire au collagène est augmentée, en présence du vWF désialylé [(Neuase)vWF] ou du vWF désialylé puis soumis à une Galactosidase [(Neu-Gal)ase vWF] (Federici et al., 1987 b), comparée à celle obtenue avec le vWF natif.

Au vu des résultats antérieurs (Goudemand et al., 1985) et du fait que les mêmes domaines du vWF et les mêmes récepteurs plaquettaires, en l'occurrence la GPIb, sont impliqués dans l'adhésion plaquettaire et dans la fixation du vWF aux plaquettes, en présence de ristocétine, nous avons, sur une même préparation, montré à la fois l'augmentation de l'adhésion plaquettaire au collagène et la diminution de la fixation aux plaquettes en présence de ristocétine. Ceci montre que la propriété du vWF à se fixer aux plaquettes en présence de ristocétine n'est pas corrélée avec son rôle dans l'adhésion plaquettaire étudiée par les systèmes de perfusion. Il est possible que ces deux propriétés soient régies par des mécanismes différents et que l'effet des monosaccharides dans l'interaction du vWF avec la plaquette soit beaucoup plus important dans la fixation du vWF en présence de ristocétine que dans l'adhésion plaquettaire.

Le deuxième commentaire à propos de ces expériences est que nous avons observé, à plusieurs reprises, que des formes du vWF modifiées par la neuraminidase et la β -galactosidase, et ayant conservé leur propriété adhésives vis-à-vis des plaquettes étaient dépolymérisées. Ceci montre, en accord avec d'autres, que les formes les plus lourdes du vWF ne sont pas indispensables à son action dans l'adhésion plaquettaire "in vitro". Afin de déterminer l'origine de l'augmentation de l'adhésion plaquettaire, nous avons également mesuré la fixation au collagène du vWF natif ou modifié par les exoglycosidases. Ainsi, nous avons montré que la fixation au collagène du Neu ase vWF n'était que légèrement augmentée, et que celle du (Neu-gal) ase vWF était similaire à celle du vWF natif. Ce résultat préliminaire ne permet pas d'affirmer que l'augmentation de l'adhésion plaquettaire résulte de l'augmentation de l'interaction plaquette/plaquette. Ceci pourrait être en relation, d'une part aux propriétés d'agrégation du PRP des préparations de Neu ase vWF et de (Neu-gal) ase vWF, et d'autre part à l'augmentation de la fixation de ces préparations aux plaquettes en présence de thrombine, qui fait intervenir les glycoprotéines IIB IIIa impliquées dans l'étalement des plaquettes et l'interaction plaquette/plaquette (Sakariassen et al., 1986).

L'ensemble de nos résultats semblent montrer que, dans les conditions employées, les monosaccharides externes du vWF n'ont pas un rôle primordial dans l'adhésion plaquettaire "in vitro". Cependant, de ces expérimentations, on ne peut nullement conclure que les glycannes du vWF n'ont aucun rôle biologique, mais à l'heure actuelle il faut admettre que ce rôle éventuel reste très controversé et demeure très difficile à étudier. En effet, on ne peut encore, de façon sûre, empêcher une dépolymérisation du vWF dont on a modifié la copule glycanique et ainsi toute interprétation sur le rôle des glycannes consécutive à l'action des glycosidases peut elle être due à un effet indirect de celles-ci sur la structure IIIaire et IVaire du vWF. De plus, différents essais entrepris dans notre laboratoire avec une endoglycosidase se sont révélés très décevants car ils ont conduit à la précipitation du vWF qui est devenu insoluble en milieu physiologique. C'est pourquoi, il nous paraît actuellement indispensable d'essayer de travailler sur les domaines fonctionnels glycopeptidiques isolés du vWF afin de pouvoir, partant de molécules moins complexes et étudiant une fonction bien particulière, déterminer si certains glycannes du vWF ont une fonction précise dans les différentes étapes du processus de l'hémostase primaire.

Disposant d'un système de mesure de l'activité fonctionnelle du vWF, il nous est également paru intéressant de l'utiliser pour étudier

l'effet des divers anticorps monoclonaux (AcM) anti-vWF récemment disponibles au laboratoire. C'est ainsi que nous avons trouvé que trois anticorps monoclonaux étaient inhibiteurs de l'adhésion plaquettaire. Parmi eux, le 211 A6, inhibiteur de l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium et au collagène, inhibe la fixation du vWF sur la plaquette en présence de ristocétine. Il est donc probable vu la littérature (cft p. 20) que cet anticorps reconnaisse un épitope situé du côté NH₂ terminales du vWF. Nous avons également montré que cet anticorps, contrairement à d'autres (Sixma et al. 1984 a) avait un effet inhibiteur de l'adhésion plaquettaire à basse vitesse de cisaillement, ce qui suggère que cet anticorps reconnaît un épitope impliqué dans l'adhésion à basse vitesse de cisaillement. En effet, comme l'a également envisagé Sixma (1987) il est possible que le rôle du vWF ne soit pas limité aux forces de cisaillement élevées mais que ce soient les limites de nos méthodes d'investigation qui ne permettraient de le mettre en évidence que dans certaines conditions. Il est également possible que ce soit la plus grande spécificité de l'AcM 211 A6 pour le site du vWF impliqué dans l'adhésion qui explique son effet inhibiteur particulier.

Deux autres AcM, le 21 A11 et le 21 H 12, fortement inhibiteurs de l'adhésion des plaquettes au collagène, mais peu inhibiteurs de celle au sous-endothélium, inhibent la fixation du vWF au collagène fibrillaire. Ces anticorps sont, par ailleurs, inhibiteurs de la fixation du vWF plasmatique au collagène. Il semble donc que ces deux anticorps soient dirigés contre le ou les sites de fixation au collagène du vWF et il nous faudra déterminer si ces deux anticorps sont dirigés contre des épitopes du même site ou contre les deux "sites collagènes" (cft p. 20) du vWF. Leur faible action inhibitrice sur l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium, prouve que des constituants du sous-endothélium, autre que le collagène, sont impliqués dans l'adhésion plaquettaire.

Enfin, la technique de perfusion s'est avérée intéressante pour apprécier l'activité de certaines fractions thérapeutiques destinées au traitement de la maladie de Willebrand. En effet, compte tenu qu'il n'existe à l'heure actuelle, aucun traitement totalement satisfaisant de la maladie de Willebrand (cft p. 124) puisque l'injection de cryoprécipité congelé qui diminue le temps de saignement comporte des risques de contamination virale, et que l'utilisation de concentrés de FVIII ayant subi une inactivation virale, s'avère peu apte à diminuer le temps de saignement, nous avons voulu vérifier que les résultats de correction de l'adhésion plaquettaire obtenus en présence de certains concentrés de FVIII étaient en corrélation avec leur

efficacité thérapeutique, ceci afin de pouvoir disposer d'un test "in vitro" permettant de prévoir l'aptitude de ces concentrés obtenus par divers procédés complétés de différentes techniques d'inactivation virale, à raccourcir le temps de saignement.

L'ensemble des résultats obtenus sur divers concentrés de F VIII thérapeutiques a montré que le cofacteur de la ristocétine n'apparaît pas du tout en corrélation avec l'adhésion plaquettaire et le temps de saignement. Le pourcentage de HPM du vWF semble être un bon indicateur de l'activité du vWF mais il ne peut à lui seul prédire l'efficacité physiologique du vWF. En effet, nous avons montré que les concentrés efficaces dans l'adhésion plaquettaire et le traitement de la maladie de Willebrand ont généralement un pourcentage de HPM de vWF plus important que ceux qui sont incapables d'induire cette adhésion. Cependant, cette différence est souvent trop petite pour prévoir l'efficacité "in vivo" du produit. Il apparaît donc que seule l'augmentation de l'adhésion plaquettaire au collagène semble bien corrélée avec la correction du temps de saignement observée "in vivo" chez les patients vWD.

Sur l'ensemble des lots que nous avons étudié, il apparaît que les concentrés de FVIII chauffés sont plus aptes à induire l'adhésion que les concentrés de FVIII traités par solvant et détergent (SD). De plus, nous avons montré que la capacité des concentrés de FVIII SD à induire l'adhésion semblait dépendante du type de matériel de départ. D'autre part, si le traitement SD par lui même n'affecte pas la structure multimérique ni les propriétés d'adhésion du vWF, il est possible cependant, mais ceci reste à vérifier, qu'il ait un effet destabilisant sur le vWF, ce qui peut expliquer la faible capacité des concentrés de FVIII SD lyophilisés à induire l'adhésion plaquettaire.

Ainsi, les techniques d'étude de l'adhésion des plaquettes radiomarquées au sous-endothélium ou au collagène, que nous avons introduites et appliquées au cours de ce travail de thèse, se sont révélées très intéressantes pour l'étude des propriétés du vWF, tant dans les études fondamentales concernant les relations structure-fonctions du facteur Willebrand, que dans le domaine transfusionnel pour l'appréciation de l'activité de concentrés thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

	<u>Pages</u>
1. AARTS P, BOLHUIS PA, SAKARIASSEN KS, HEETHAAR RM, SIXMA JJ. Red blood cell size is important for adherence of blood platelets to artery subendothelium. <i>Blood</i> , 62, 214, 1983.	43
2. AARTS P, VAN DEN BROEK JATHM, KUIKEN GDC, SIXMA JJ, HEETHAAR RM. Velocity profiles in an annular perfusion chamber measured by Laser-Doppler velocimetry. <i>J. Biomechanics</i> , 12, 61-63, 1984a.	44
3. AARTS P, HEETHAAR RM, SIXMA JJ. Red blood cell deformability influences platelet vessel wall interaction in flowing blood. <i>Blood</i> , 64, 1228-1233, 1984b.	43
4. ADELMAN B, STEMERMAN MB, MENNELL D. The interaction of platelets with aortic subendothelium : Inhibition of adhesion and secretion by prostaglandin I ₂ . <i>Blood</i> , 58, 198, 1981.	18
5. AIHARA M, TAKAMI H, SAIVADA Y, MORIMOTO S, KARIYA K, KUDO I, VENO K, KIMURA A, YOSHIDA Y. Effect of fibronectin and von Willebrand factor on the adhesion of human fixed washed platelets to collagen immobilized beads. <i>Thrombosis Research</i> 44, 661-672, 1986.	36
6. ALLAIN JP, COOPER HA, WAGNER RH, BRINKHOUS KM. Platelets fixed with paraformoldehyde a new reagent for assay of von Willebrand factor and platelet aggregating factor. <i>J. Lab. Clin. Med.</i> , 85, 318-328, 1975.	31
7. BARLETT A, DORMANDY KH, HAWKEY CH, STABLEFORSH P, VOLLER A. Factor VIII-related antigen : measurement by enzyme immunoassay. <i>Brit. Med. J.</i> , 1, 994-996, 1976.	27
8. BARLOW GH, MARTIN SE, MARDER VJ. Sedimentation analysis of von Willebrand factor and factor VIII:C protein using partition cells in the analytical ultracentrifuge. <i>Blood</i> , 63, 940-943, 1984.	23
9. BAUMGARTNER HR, HAUDENSCHILD C. Adhesion of platelets to subendothelium. <i>Annals of the New York Acad. of Sciences</i> , 201, 22-36, 1972.	1, 6, 29, 146
10. BAUMGARTNER HR, MUGGLI R, TSCHOPP TB. Platelet adhesion, release and aggregation in flowing blood. Effect of surface properties and platelet function. <i>Thromb. Haemostas.</i> , 35, 124, 1976.	8, 18
11. BAUMGARTNER HR, TSCHOPP TB and WEISS HJ. Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood II. Impaired adhesion aggregation in bleeding disorders. A comparison with subendothelium. <i>Thromb. Haemostas.</i> , 37, 17-28, 1977.	16
12. BECKER CG, LEVI R, ZAVECZ J. Induction of IgE antibodies to antigen isolated from tobacco leaves and from cigarette smoke condensate. <i>Am. J. Pathol.</i> , 96, 249, 1979.	18
13. BLATT PM, BRINKCHOUS KMM, CULP HR, KRAUSS JS and ROBERT HR. Antihemophilic factor concentrates therapy in von Willebrand's disease. Dissociation of bleeding time and ristocetin cofactor activities. <i>JAMA</i> , 236, 2770-2772, 1976.	35

14. BOCKENSTEDT P, GREENBERG JM, and HANDIN RI. Structural basis of von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib and collagen (Effects of disulfide reduction and limited proteolysis of polymeric von Willebrand factor). *J. Clin. Invest.*, 77, 743-749, 1986. 32
33
15. BOLHUIS PA, SAKARIASSEN KS, SANDER HJ, BOUMA BN, SIXMA JJ. Binding of factor VIII von Willebrand factor to human arterial subendothelium precedes increased platelet adherence and enhances platelet spreading. *J. Lab. Clin. Med.*, 97, 568-576, 1981. 34
35
16. BORN GUR, WEHMEYER A. Inhibition of platelet thrombus formation by chlorpromazine acting to diminish haemolysis. *Nature*, 282, 212-213, 1979. 43
17. BROOK TG, MARMUR A, BERLOVITCH Y, AVIRAM M. Platelet adhesion in hyperlipidemie and hypertensive patient. *Haemostasis*, 15, 371-376, 1985. 18
18. BROWN JE, BOSACK JO. An Elisa test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. *Thrombosis Research*, 43, 303-311, 1986. 33
19. CAZENAVE JP, DEJANA E, KINLOUGH-RATHBONE RL. Prostaglandin I2 and E1 reduce rabbit and human platelet adherence without inhibiting serotonin release from adherent platelets. *Thromb. Res.*, 15, 273, 1979. 18
20. CAZENAVE JP, KINLOUGH-RATHBONE RL, PACKMAN MA. The effect of acetylsalicylic acid and indomethacin on rabbit platelet adherence to collagen and the subendothelium in the presence of a low or high hematocrit. *Thromb. Res.*, 971, 1978a. 17
21. CAZENAVE JP, PACKMAN MA, DAVIES JA. Studies of platelet adherence to collagen and subendothelium. *Platelet Function Testing*, DHEW Publication N°78-01087, 181, 1978b. 15
18
22. CAZENAVE JP, PACKMAN MA, GUCCIONE MA. Inhibition of platelet adherence to a collagen coated surface by agents that inhibit platelet shape change and clot retraction. *J. Lab. Clin. Med.*, 84, 483, 1974. 18
23. CAZENAVE JP, PACKMAN MA, KINLOUGH-RATHBONE RL. Platelet adherence to the vessel wall and to collagen-coated surfaces. *Animal and Clinical models*, NY, *Advances in experimental Medicine and Biology*, 102, 31, 1978c. 18
24. CAZENAVE JP, REIMERS HJ, KINLOUGH-RATHBONE RL. Effects of sodium periodate on platelet functions. *Lab. Invest.*, 34, 471, 1976. 16
25. CHANDRA RAJAN J. Separation of type III collagen from type I collagen and pepsin by differential denaturation and retanuration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 180-186, 1978. 47
26. CHESNEY CM, PIFER DD, DABBOUS MK. The role of the telopeptide region of collagen in the platelet-collagen interaction. *Thromb. Res.*, 14, 445, 1979. 12
27. CHOPEK MW, GIRMA JP, FUJIKAWA K, DAVIES EW, TITANI K. Human von Willebrand factor : a multivalent protein composed of identical subunits, *Biochemistry*, 25, 3171, 1986. 28
28. CLEMETSON KJ, Mc GREGOR JL, JAMES E. Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernar Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high resolution two dimensional gel electrophoresis. *J. Clin. Invest.*, 70, 304-311, 1982. 32

29. COLLIER BS AND GRALNICK HR. Studies on the mechanism of ristocetin-induced platelet agglutination. Effects of structural modification of ristocetin and vancomycin. *J. Clin. Invest.*, 60, 302-312, 1977. 31
30. DEBEIRE P, MONTREUIL J, SAMOR B, MAZURIER C, GOUEMAND M, VAN HALBEEK H and VLIEGENTHART JFG. Structure determination of the major asparagine-linked sugar chain of human factor VIII/von Willebrand factor. *FEBS Letters* 151, 22-26, 1983. 25
31. DE MARCO L, GIROLAMI A, RUSSELL S and RUGGERI ZM. Interaction of asialo von Willebrand factor with glycoprotein Ib induces fibrinogen binding to the glycoprotein Iib/IIIa complex and mediates platelet aggregation. *J. Clin. Invest.*, 75, 1198-1203, 1985a. 38
32. DE MARCO L, MAZZUCARO M., GRAZIA DEL BEN M., BUDDE V., FEDERICI AB, GIROLAMI A, RUGGERI ZM. Type Iib von Willebrand factor with normal sialic acid content induces platelet aggregation in the absence of ristocetin. *J. Clin. Invest.*, 80, 475-482, 1987. 37
33. DE MARCO L and SHAPIRO SS. Properties of human asialo factor VIII. A ristocetin-independent platelet aggregating agent. *J. Clin. Invest.*, 68, 321-328, 1981. 38
34. DE MARCO L, ZIMMERMAN TS and RUGGERI ZM. Interaction of IIB von Willebrand factor with glycoprotein Ib induces exposure of receptors on glycoprotein Iib/IIIa and initiates platelet aggregation. *Thromb. Haemostas.*, 54, 219 (Abstr), 1985b. 37
35. DOUCET DE BRUINE MHM, SIXMA JJ, OVER J and BEESER-VISSER NH. Heterogeneity of human factor VIII. II Characterization of forms of factor VIII binding to platelets in the presence of ristocetin. *J. Lab. Clin. Med.*, 92, 96-107, 1978. 31
36
36. ELDER JH and ALEXANDER S. Endo- β -N-acetylglucosaminidase F : endoglycosidase from *Flavobacterium meningosepticum* that cleaves both high-mannose and complex glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4540-4544, 1982. 40
37. ESCOLAR G, BATISDA E, ORDINAS A, CASTILLO R. Interaction of platelets with subendothelium in humans treated with aspirin and dipyridamole alone or in combination. *Thromb. Res.*, 40, 419-424, 1985. 18
38. FAUVEL F., GRANT HE, LEGRAND YJ, SOUCHON H, TOBELEM G, JACKSON DS, CAEN JP. Interaction of blood platelets with a microfibrillar extract from adult bovin aorta. Requirement for von Willebrand factors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 80, 551-554, 1983. 9
39. FEDERICI AB, BERKOWITZ. Carbohydrate prevents loss of large von Willebrand factor multimers by protecting against amino terminal proteolytic cleavage. *Thromb. Haemos.*, 58, Brunels wingren, Abst. 74, 1987a. 103
147
40. FEDERICI AB, ELDER JH, DE MARCO L, RUGGERI ZM and ZIMMERMAN TS. Carbohydrate moiety of von Willebrand factor is not necessary for maintaining multimeric structure and ristocetin cofactor activity but protects from proteolytic degradation. *J. Clin. Invest.*, 74, 2049-2055, 1984. 38, 39,
40, 41,
102

41. FEDERICI AB, DE ROMEUF C, DE GROOT PG, SAMOR B, LOMBARDI R, D'ALELIO P, MAZURIER C, MANNUCI PM, SIXMA JJ. Adhesive properties of the carbohydrate-modified von Willebrand factor (CHO-vWF). *Blood*, 1987b, sous presse. 41
147
42. FOSTER PA, FULCHER CA, MORTI T, TITANI K, ZIMMERMAN TS. A factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residue of von Willebrand factor. *Thromb. Haemostas.*, 58, Abstr. 76, 1987. 30
43. FOWLER WE and FRETTO LJ. The protomer of human von Willebrand factor (vWF) : another trimeric structure. *Thromb. Haemostas.*, 54, 224 (Abstr.), 1985. 23
44. FOWLER WE, FRETTO LJ, HAMILTON KK, ERICKSON HP, MCKEE PA. Substructure of human von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.*, 76, 1491-1500, 1985. 21
45. FRESSINAUD E, SADLER JE, GIRMA JP, BAUMGARTNER HR, MEYER D. Synthetic RGD containing peptides of von Willebrand factor inhibit platelet adhesion to collagen. *Thromb. Haemostas.*, 58, Abstr. 792, 1987. 17
46. FRETTO IJ, FOWLER WE, MCCASLIN DR, ERICKSON HP and MCKEE PA. Substructure of human von Willebrand factor. Proteolysis by V8 and characterization of two functional domains. *J. Biol. Chem.*, 261, 15679-15689, 1986. 30
47. FUJIMURA Y, TITANI K, HOLLAND LZ, RUSSEL RS, ROBERTS JR, ELDER JH, RUGGERI ZM, ZIMMERMAN TS. Von Willebrand factor. A reduced and alkylated 52/48 kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.*, 261, 381-385, 1986. 29
124
48. FUKUI H, MIKAMI S, OKUDA T, MURASHIMA N, TAKASE T and YOSCHIOKA A. Studies on von Willebrand factor : effect of different kinds of carbohydrate oxidases SH-inhibitors and some other chemical reagents. *Br. J. Haematol.*, 36, 259-270, 1977. 40
49. FURLAN M, PERRET BA and BECK EA. Studies on factor VIII-related protein IV. Interaction of galactose-specific lectins with human factor VIII/von Willebrand factor. *Biochim. Biophys. Acta*, 623, 402-411, 1980. 41
50. FUSTER V, CHESEBORO JH, FORGE RL. Platelet survival and the development of coronary artery disease in the young adult : Effects of cigarette smoking, strong family history and medical therapy. *Circulation*, 63, 546, 1981. 18
51. GINSBURG D, HANDIN RI, BONTHRON DT, DONLON TA, BRUNS GAP, LATT SA and ORKIN SH. Human von Willebrand factor (vWF) : Isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosome localization. *Science*, 228, 1401-1406, 1985. 21
52. GIRMA JP, CHOPEK MW, TITANI K, DAVIE EW. Limited proteolysis of human von Willebrand factor by staphylococcus aureus V8-protease. Isolation and partial characterization of a platelet binding domain. *Biochem.*, 25, 3156-3163, 1986a. 29
30
53. GIRMA JP, KALAFATIS M, PIETU G, LAVERGNE JM, CHOPEK MW, EDGINGTON THS, MEYER D. Mapping of distinct von Willebrand factor domains interacting with platelet GPIb and GPIIb/IIIa and with collagen using monoclonal antibodies. *Blood*, 67, 1356-1366, 1986b. 29
30
54. GOODALL AH, MEYER D. Registry of monoclonal antibodies to factor VIII and von Willebrand factor. International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb. Haemost.*, 54, 878-891, 1985. 103

55. GOUDEMAM J, MAZURIER C, SAMOR B, BOUQUELET S, MONTREUIL J, GOUDEMAM M. Effect of carbohydrate modifications of factor VIII/von Willebrand factor on binding to platelets. *Thromb. Haemos.*, 53, 390, 1985. 39, 40, 89, 146, 147
56. GRALNICK HR. Factor VIII/von Willebrand factor protein : galactose, a cryptic determinant of von Willebrand factor activity. *J. Clin. Invest.*, 62, 496-500, 1978. 39 40
57. GRALNICK HR, COLLER BS and SULTAN Y. Carbohydrate deficiency of the factor VIII/von Willebrand factor protein in von Willebrand's disease variants. *Nature*, 192, 56-59, 1976. 37
58. GRALNICK HR, CREGGER MC and WILLIAMS SB. Characterization of the defect of the factor VIII/von Willebrand factor protein in von Willebrand's disease. *Blood*, 59, 542-548, 1982. 38
59. GRALNICK HR, RICK ME, McKEOWN LP, WILLIAMS SB, PARKER RI, MAISONNEUVE P, JENNEAU E, SULTAN Y. Platelet von Willebrand factor : an important determinant of the bleeding time in type I von Willebrand's disease. *Blood*, 68, 58-61, 1986. 19
60. GRALNICK HR, WILLIAMS SB and COLLER BS. Asialo von Willebrand Factor interactions with platelets. Interdependence of glycoproteins Ib and IIb/IIIa for binding and aggregation. *J. Clin. Invest.*, 75, 19-25, 1985. 38
61. GRALNICK HR, WILLIAMS SB and RICK ME. Role of carbohydrate in multimeric structure of factor VIII/von Willebrand factor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2771-2274, 1983. 39 40
62. GREEN D and POTTER EV. Failure of AHF-concentrate to control bleeding in von Willebrand's disease. *Am. J. Med.*, 60, 357-360, 1976. 35
63. GREENBERG J, PACKMAN MA, CAZENAVE JP. Effect on platelet function of removal of platelet sialic acid by neuraminidase. *Lab. Invest.*, 32, 476, 1975. 16
64. GRINNELL F, FELD M, SNELL W. The influence of cold-in-soluble globulin on platelet morphological response to substrata. *Cell. Biol. Int. Rep.*, 3, 385, 1979. 13
65. GROVES HM, KINLOUGH-RATHBONE RL, RICHARDSON M et al. Platelet interaction with damaged rabbit aorta. *Lab. Invest.*, 40, 194, 1979. 3
66. HAMILTON KK, FRETTO LJ, GRIERSON DS, McKEE PA. Effects of plasmin on von Willebrand factor multimers. *J. Clin. Invest.*, 76, 261-270, 1985. 21
67. HAVERSTICK DM, COWAN JF, YAMADA KM, SANTORO SA. Inhibition of platelet adhesion to fibronectin, fibrinogen and von Willebrand factor substrates by a synthetic tetrapeptide derived from the cell-binding domain of fibronectin. *Blood*, 66, 946-955, 1985. 30
68. HELLERQUIST CG, SINATRA R and SIEGEL J. Role of vWF oligosaccharides in platelet adhesion 8 th International Symposium on Glycoconjugates - HOUSTON, 8-13 September, 1985, p. 389 (Abstr). 41
69. HOUDIJK WPM, GIRMA JP, VAN MOURIK JA, SIXMA JJ, MEYER D. Functional domains on von Willebrand factor. Comparison of tryptic fragments involved in binding to thrombin-activated platelets with domains involved in ristocetin-induced binding and binding to collagen. In press. 30

70. HOUDIJK WPM, DE GROOT PG, NIEVELSTEIN PFEM, SAKARIASSEN KS, SIXMA JJ. Von Willebrand factor and fibronectin but not thrombospondin are involved in platelet adhesion to the extracellular matrix of human vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis*, 6, 24-33, 1986a. 15
71. HOUDIJK WPM, SAKARIASSEN KS, NIEVELSTEIN PFEM, SIXMA JJ. Role of factor VIII-von Willebrand factor and fibronectin in the interaction of platelets in flowing blood with monomeric and fibrillar human collagen types I and III. *J. Clin. Invest.*, 75, 531-540, 1985a. 12, 13
14, 15
34
72. HOUDIJK WPM, SAKARIASSEN KS, OTTENHOF ROVERS M, SIXMA JJ, RAUTERBERG J. Platelet interaction with interstitial and basement membrane collagen. *Thromb. Haemostas.*, 50, 190 (Abstr.), 1983. 12
73. HOUDIJK WPM, SCHIPHORST ME, SIXMA JJ. Identification of functional domains on von Willebrand factor by binding of tryptic fragments to collagen and to platelets in the presence of ristocetin. *Blood*, 67, 1498-1503, 1986b. 14, 29
30, 33
74. HOUDIJK WPM, SIXMA J. Fibronectin in artery subendothelium is important for platelet adhesion. *Blood*, 65, 598-604, 1985b. 14
75. HOYER LW. Von Willebrand's disease in spaet TH (ed) : Progress in hemostasis and thrombosis. New York, G 5, 231, 1976. 13
76. HOYER LW, SHAINOFF JR. Factor VIII related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers. *Blood*, 55, 1056-1059, 1980. 23
28
77. HOWARD MA, FIRKIN BG. Ristocetin a new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb. Diath. Haemos.*, 26, 362-369, 1971. 27
31
78. HOWARD MA, HENDRIX H and FIRKIN BG. Further studies on the factor VIII of a patient with a variant form of von Willebrand's disease. *Thromb. Res.*, 14, 609-619, 1979. 37
79. HOWARD MA, HUTTON RA, HARDISTY RR. Hereditary giant platelet syndrome ; a disorder of a new aspect of platelet function. *Cr. Med. J.*, 2, 586-583, 1973a. 32
80. HOWARD MA, PERKIN J, KOUTTS J and FIRKIN BG. Quantitation of binding of factor VIII antigen to concanavalin A. *Br. J. Haematol.*, 47, 607-615, 1981. 37
81. HOWARD MA, SAWERS RJ, FIRKIN BG. Ristocetin : a mean of differentiating von Willebrand's disease into two groups. *Blood*, 41, 687-690, 1973b. 31
82. HUDGIN RL, PRICER WE, ASHWELL G, STOCKERT RJ and MORRELL AG. The isolation and porperties of a rabbit liver binding protein specific for asialo-glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 249, 5536-5543, 1974. 39
83. HYNES RD, ALI IV, DESTREE AT. A large glycoprotein lost from the surfaces of transformed cells. *Ann. NY Acad. Sci.*, 312, 317, 1978. 13
84. ILL CR, ENGVALL E, RUOHLAHTI E. Aehsion of platelet to laminin in the absence of activation. *J. Cell. Biol.*, 99, 2140-2145, 1984. 15
85. JAFFE RM. Interaction of platelets with connective tissue, in Gordon JL (ed). *Platelet in biology and pathology*, 1, New York, Elsevier North Holland, 261, 1976. 9
12

86. JAFFE EA, HOYER LW and NACHMAN RL. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 71, 1906-1909, 1974. 19
21
87. JORIEUX S, MAGALLON T, MAZURIER C. Evidence that NH₂-terminal but not COOH-terminal moiety of plasma vWF binds to FVIII light chain. Thromb. Res., In press, 1987. 30
88. KALAFATIS M, TAKAHASHI Y, GIRMA JP, MEYER D. A monomeric von Willebrand factor fragment (SpI) located between amino acid residues 911 and 1365 contains a domain interacting with collagen. Blood, 68 (suppl.), 348a, 1986. 30
89. KARNIGUIAN A, LEGRAND YJ, CEAN JP. Prostagandins specific inhibition of platelet adhesion to collagen and relationship with cAMP level. Prostaglandins, 23, 437, 1982. 18
90. KAO KJ, PIZZO SV and Mc KEE PA. Demonstration and characterization of specific binding sites for factor VIII/von Willebrand factor on human platelets. J. Clin. Invest., 63, 656-664, 1979. 31
91. KAO KJ, PIZZO SV and Mc KEE PA. Factor VIII/von Willebrand protein. Modification of its carbohydrate causes reduced binding to platelets. J. Biol. Chem., 255, 10134-10139, 1980. 39
92. KESSLER CM, FLOYD CM and FRANZ S. Effect of carbohydrate modification on factor VIII/von Willebrand factor protein-collagen interaction. Clin. Res., 31, 316 (Abstr.), 1983. 38
93. KESSLER CM, FLOYD CM, RICK ME, KRIZEK DM, LEE SC and GRALNICK HR. Collagen-factor VIII/von Willebrand factor protein interaction, Blood, 63, 1291-1298, 1984. 33
94. KIRBY EP and MILLS DCB. The interaction of bovine factor VIII with human platelets. J. Clin. Invest., 56, 491-502, 1975. 38
95. KOTELIANSKY VE, LEYTIN VL, SVIRIDOV DD. Human plasma fibronectin promotes the adhesion and spreading of platelets on surfaces coated with fibrillar collagen. FEBS Letters, 123, 59, 1981. 13
96. KOTITE NJ, CUNNINGHAM LW. Specific adsorption of a platelet membrane glycoprotein by human insoluble collagen. J. Biol. Chem., 261, 8342-8347, 1986. 13
97. LAHAV J, MEYER FA. On the role of the major platelet membrane glycoproteins in platelet adhesion to collagen. Thromb. Res., 22, 457, 1981. 15
98. LAWRENCE JB and GRALNICK HR : Asialo-von Willebrand factor inhibits platelet adherence to human arterial subendothelium : discrepancy between ristocetin cofactor activity and primary hemostatic fonction. Blood, 70, 1084-1089, 1987. 103
99. LEGAZ ME, SCHMER G, COUNTS RB, DAVIES EW. Isolation and characterization of human factor VIII (antihemophilic factor). J. Biol. Chem., 248, 3946-3955, 1973. 19

100. LEGRAND Y, KARNIGUIAN A, FAUVEL F. The adhesion of blood platelets to collagen molecular features of collagen. *Nouv.Rev.Fr.Hematol.*, 23, 143, 1981. 12
101. LEGRAND YJ, RODRIGUEZ-ZEBALLOS A, KARTALIS G. Adsorption of factor VIII antigen-activity complex by collagen. *Thromb. Res.*, 13, 909, 1978. 33
102. LOSCALZO J, HANDIN RI. Conformational and structural transitions of human von Willebrand protein. *Biochemistry*, 23, 3880-3886, 1984. 23
103. MANSO M, DE DIOS I, ALBERCA L, VINCENTE V. Studies on platelet surface carbohydrates in normal and uraemic platelets using ¹²⁵I labelling lectins. *Blut* 50, 287-292, 1985. 16
104. MARCHESI SL, SHULMAN NR, GRALNICK HR. Studies on the purification and characterization of human factor VIII. *J.Clin.Invest.*, 51, 2151-2161, 1972. 19
105. MARTIN SE, FRANCIS CW and MARDER VJ. Potentiation of wheat germ agglutinin aggregation of platelets by von Willebrand protein and by a 116 000 molecular weight tryptic fragment. *Thromb. Res.*, 31, 437-449, 1983. 41
106. MARTINACHE L, BURNOUF T, VAUTIER D, MAZURIER C, HUART JJ, GOUEMAND M. Fractions antihémophiliques chauffées - validation par l'institut Pasteur d'un procédé d'inactivation du virus LAV. *La nouvelle gazette de la transfusion*, 39, 812, 1985. 125
107. MAZURIER C, MAILLARD J, PARQUET-GERNEZ A, GOUEMAND M. Etude d'un concentré thérapeutique de facteur VIII/vWF préparé en circuit clos. *Rev. Franc. de Transf. et Immuno-hemato.*, 25-1, 25, 1982. 124
108. MAZURIER C, PARQUET-GERNEZ A, 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. 27
109. MAZURIER C, DE ROMEUF C, PARQUET-GERNEZ A, JORIEUX S, GOUEMAND M. In vitro and in vivo evaluation of a factor VIII concentrate heat-treated to inactivate HTLV-III/LAV viruses. *Vox Sanguinis*, 1987. 125
110. MAZURIER C, SAMOR B, GOUEMAND M. Improved characterization of plasma von Willebrand factor heterogeneity when using 2.5 % agarose gel electrophoresis. *Thromb. Haemostas.*, 55, 61, 1986. 23
111. MERRIL EW. Rheology of blood. *Physiol. Rev.*, 49, 863-888, 1969. 44
112. MICHELSON AD, LOSCALZO J, MELNICK B, COLLER BS and HANDIN RI. Partial characterization of a binding site von Willebrand factor on glycolalicin. *Blood*, 67, 19-26, 1986. 32
113. MIKAMI S, VEDA M, YASVI M, TAKAHASHI Y, NISHINO M and FUKUI H. Heterogeneity of sugar composition of factor VIII/von Willebrand factor in von Willebrand's disease analysis by crossed affino-immunoelectrophoresis using lectin (*Ricinus Communis* Agglutinin 120). *Thromb. Haemostas.*, 49, 87-90, 1983. 37
114. MORISATO DK and GRALNICK HR. Selective binding of the factor VIII/von Willebrand factor protein to human platelets. *Blood*, 55, 9-15, 1980. 28, 31
39, 40

115. MORTON LF, GRIFFIN B, PEPPER DS and BARNES MJ. The interaction between collagens and factor VIII/von Willebrand factor : investigation of the structural requirements for interaction. *Thromb. Res.*, 32, 545-556, 1983. 33
116. MUGGLI R, BAUMGARTNER HR. Collagen induced platelet aggregation : requirement for tropocollagen multimers. *Thromb.Res.*, 3, 715-, 1973. 11
117. NIEUWENHUIS HK, SAKARIASSEN KS, HOUDIJK WPM, NIEVELSTEIN PFEM and SIXMA JJ. Deficiency of platelet membrane glycoprotein Ia associated with a decreased platelet adhesion to subendothelium : a defect in platelet spreading. *Blood* 68, n°3, 692-695, 1986. 13
118. NIIYA K, KOSTEL P, ZIMMERMAN TS, RUGGERI ZM. Characterization of a 40 kDa fragment of von Willebrand factor that contains the glycoprotein IIb IIIa-binding domain. *Thromb. Haemostas.*, 58, Abstr. 75, 1987. 30
119. NYMAN D. Von Willebrand factor dependant platelet aggregation and adsorption of factor VIII related antigen by collagen. *Thromb. Res.*, 17, 209, 1980. 33
120. PARSONS IJ, HAYCRAFT DL, HOAK JC, SAGE H. Interaction of platelets and purified collagens in a laminar flow model. *Thromb. Res.*, 43, 435-443, 1986. 12
121. PAULSSEN MMP, Van DE GRAAF-WILDSCHUT M, KOHLHORN A, PLANJE MC. Radioimmunoassay of antihemophilic factor (factor VIII) antigen. *Clin. Chim. Acta*, 63, 349-353, 1975. 27
122. PERRET BA, FURLAN M, BECK EA. Studies on factor VIII related protein II. Estimation of molecular size differences between factor VIII oligomers. *Biochim.Biophys.Acta* 578, 164-174, 1979. 23
123. PETERSON DM, STATHOPOULOS NA, GIORGIO TD, HELLUMS JD and MOAKE JL. Shear-induced platelet aggregation requires von Willebrand factor and platelet membrane glycoprotein Ib and IIb IIIa. *Blood*, 69, 2, 625-628, 1987. 33
124. PRINCE AM, HOROWITZ B, BROTHMAN B. Sterilization of hepatitis and HTLV III viruses by exposure to tri (n butyl) phosphate and sodium cholate. *The Lancet*, I, 706-710, 1986. 125
125. PUETT D, WASSERMAN BK, FORD JD. Collagen mediated platelet aggregation. Effects of collagen modification insolving the protein and carbohydrate moieties. *J.Clin.Invest.*, 52, 2495, 1972. 12
126. ROTH GJ, TITANI K, HOYER LW, HICKEY MJ. Localisation of collagen binding sites(s) within human von Willebrand factor. *Blood* 68 (suppl.) 352a, 1986. 124
127. RUAN C, DU X, XI X, CASTALDI P, BERND MC. A murine antiglycoprotein Ib complex monoclonal antibody, SZ 2, inhibits platelet aggregation induced by both ristocetin and collagen. *Blood* 69, n°2, 570-577, 1987. 13
128. RUAN C., TOBELEM G, Mc MICHAEL AS, DROUET L, LEGRAND Y, DEGOS L, KIEFFER N, LEE H and CAEN JP. Monoclonal antibody to human platelet glycoprotein I. II Effects on human platelet function. *Br.J.Haemat.*, 49, 511-519, 1981. 16

129. RUGGERI ZM, BADER R and DE MARCO L. Glanzmann thrombasthenia : deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 79, 6038-6041, 1982. 32
130. RUGGERI ZM, DE MARCO L, GATTI L, BADER R and MONTGOMERY RR. Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. J.Clin.Invest., 72, 1-12, 1983. 31
32
131. RUGGERI ZM and ZIMMERMAN TS. The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor. Blood, 57, 1140-1143, 1981. 23
28
132. SAKARIASSEN KS, AARTS PAMM, DE GROOT PhG, HOUDIJK WPM, SIXMA JJ. A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix and purified components. J. Lab.Clin.Med., 102, 522-535, 1983. 1, 8, 29
43
146
133. SAKARIASSEN KS, BANGA JD, DE GROOT PG, SIXMA JJ. Comparison of platelet interaction with subendothelium of human renal and umbilical arteries and the extracellular matrix produced by human venous endothelial cells. Thromb. Haemostas., 52, 60-65, 1984. 6
134. SAKARIASSEN KS, BOLHUIS PA, SIXMA JJ. Platelet adherence to subendothelium of human arteries in pulsatile and steady flow. Thromb. Res., 19, 547-559, 1980. 34
42,43
135. SAKARIASSEN KS, FRESSINAUD E, GIRMA JP, BAUMGARTNER HS, MEYER D. Mediation of platelet adhesion to fibrillar collagen in flowing blood by a proteolytic fragment of human von Willebrand factor. Blood, 67, 1515, 1986. 36
136. SAKARIASSEN KS, NIEVELSTEIN PFEM, COLLIER BS, SIXMA JJ. The role of glycoproteins Ib and IIb IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium. Br.J.Haematol., 63, 681-691, 1986. 16, 17
146
137. SAMOR B, MAZURIER C, GOUEMAND M, DEBEIRE P, FOURNET B, MONTREUIL J. Preliminary result on the carbohydrate moiety of factor VIII/von Willebrand factor (FVIII/vWF). Thromb. Res., 25, 81-89, 1982. 25
148
138. SAMOR B, MICHALSKI JC, DEBRAY H, MAZURIER C, GOUEMAND M, VAN HALBEEK H, Vliegenthart JFG, MONTREUIL J. Primary structure of a new tetraantennary glycan of the N-acetyl lactosaminic type isolated from human factor VIII/von Willebrand factor. Eur. J. Biochem., 158, 225, 1986. 25
146
139. SAMOR B, MICHALSKI JC, STRECKER G, MAZURIER C, GOUEMAND M, VAN HALBEEK H, Vliegenthart JFG, MONTREUIL J. Primary structure of the major O glycan from human von Willebrand factor. IV International symposium on glycoconjugates. Abst. A 42, 1987. 25
146
140. SANTORO SA. Adsorption of von Willebrand factor/factor VIII by the genetically distinct interstitial collagens. Thromb. Res. 21, 689-693, 1981. 33
141. SANTORO SA. Preferential binding of high molecular weight forms of von Willebrand factor to fibrillar collagen. Biochim. Biophys. Acta, 756, 123-126, 1983. 33
142. SANTORO SA, CUNNINGHAM LW. Collagen-mediated platelet aggregation. Evidence for multivalent interactions of intermediate specificity between collagen and platelets. J. Clin. Invest., 60, 1054, 1977. 12

143. SANTORO SA, CUNNINGHAM LW. The interaction of platelets with collagen, in Gordon JL (ed). Platelet in biology and pathology 2, New York, Elsevier North Holland, 249, 1981. 12
144. SCOTT DM, GRIFFIN B, PEPPER DS. The binding of purified factor VIII/von Willebrand factor to collagens of differing type and form. *Thromb. Res.*, 24, 467, 1981. 9
145. SHADLE PJ, BARONDES SH. Platelet-collagen adhesion. Evidence for participation of antigenically distinct entities. *J. Cell. Biol.*, 99, 2048-2055, 1984. 33
146. SHADLE PJ, GINSBERG MH, PLOW EF, BARONDES SH. Platelet-collagen adhesion : inhibition by a monoclonal antibody that binds glycoprotein IIb. *J. Cell. Biol.* 99, 2056-2060, 1984. 13
147. SHEPPARD BL. The effect of acetylsalicylic acid on platelet adhesion in the injured abdominal aorta. *Quart. J. Exp. Pathol.*, 57, 319, 1972. 17
148. SIXMA JJ. Platelet adhesion in health and disease. *Thrombosis and Haemostasis*, XIth Congress Haemostasis, 1987. 149
149. SIXMA JJ, SAKARIASSEN KS, BEESER-VISSER NH, OTTENHOF-ROVERS M, BOLHUIS PA. Adhesion of platelets to artery subendothelium : effect of factor VIII - von Willebrand factor of various multimeric composition. *Blood*, 63, 128-139, 1984. 36
102
149
150. SIXMA JJ, SAKARIASSEN KS, STEL HV, HOUDIJK WPM, IN DER MAUR DW, HAMER RJ, DE GROOT PG, VAN MOURIK JA. Functional domain on von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 74, 736, 1984b. 21
29
110
151. SODETZ JM, PIZZO SV and Mc KEE PA. 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. 39
152. SPORN LA, CHAVIN SI, MARDER VJ, WAGNER DD. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J. Clin. Invest.*, 76, 1102-1106, 1985. 19
21
153. STEL VH, SAKARIASSEN KS, DE GROOT PG, VAN MOURIK JA, SIXMA JJ. The von Willebrand factor in the vessel wall mediates platelet adherence. *Blood*, 65, 85-90, 1985. 35
110
117
154. SZYMANOWICZ AG, BELLON G, LAURAIN-GUILLAUME G, DELVINCOURT T, RANDOUX A, CAULET T, BOREL JP. An evaluation by sequential extraction of the proportions of collagen types from medium sized arteries. *Artery* 10, 250-265, 1982. 49
155. TAKAHASHI Y, GIRMA JP, KALIFATIS M, SEWERIN K, ANDERSSON LO, MEYER D. Localization of a factor VIII binding domain on the N-terminal portion (fragments Sp III) of von Willebrand factor. *Thromb. Haemost.*, 58, Abstr. 77, 1987. 30
156. TITANI K, KUMAR S, TAKIO K, ERICSSON LH, WADE RD, ASHIDA K, WALSH KA, CHOPEK MW, SADLER JE and FUJIKAWA K. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry*, 25, 3171-3184, 1986. 23
25
157. TOBELEM G, LEVY-TOLEDANO S, BREDOUX R, MICHEL H, NURDEN A and CAEN JP. New approaches to determination of specific functions of platelet membrane sites. *Nature*, 263, 427-429, 1976. 32

158. TSCHOPP TB, WEISS HJ, BAUMGARTNER HR. Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrand's disease. *J. Lab. Clin. Med.*, 83, 296-300, 1974. 34
159. TSCHOPP TB, WEISS HJ and BAUMGARTNER HR. Interaction of thrombasthenic platelets with subendothelium : normal adhesion, absent aggregation. *Experientia* 31, 113-115, 1975. 16
160. TURITTO VT, BAUMGARTNER HR. Platelet deposition on subendothelium exposed to flowing blood. Mathematical analysis of physical parameters. *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs* 21, 593-600, 1975. 43
161. TURITTO VT, WEISS HJ. Red blood cells. Their dual role in thrombus formation. *Science* 203, 541-543, 1980. 43
162. TURITTO VT, WEISS HJ, BAUMGARTNER HR. Decreased platelet adhesion on vessel segments in von Willebrand's disease : a defect in initial platelet attachment. *J. Lab.Clin.Med.*, 102, 551-564, 1983. 35
163. TUSZYNSKI GP, ROTHMZN VL, MURPHY A, SIEGLER K, SMITH L, SMITH S, KARCZEUSKI J and KNUDSEN KA. Thrombospondin promotes cell and platelet substratum adhesion. *Thrombosis and Haemostasis*, 1, 58, Abstr. 1021, 1987. 15
164. VAN MOURIK JA, BOLHUIS PA. Dispersity of human factor VIII-von Willebrand factor. *Thromb. Res.*, 13, 15-24, 1978. 23
165. VERMYLEN J, BOTTECHIA D and SZPILMAN H. Factor VIII and human platelet aggregation III. Further studies on aggregation of human platelets by neuraminidase-treated human factor VIII. *Br.J.Haematol.*, 34, 321-330, 1976. 38
166. VERMYLEN J, DONATI MB, DE GAETANO F and VERSTRAETE M. Aggregation of human platelets by bovine or human factor VIII. Role of carbohydrate side chains. *Nature*, 244, 167-168, 1973. 40
167. VERMYLEN J, DE GAETANO G, DONATI MB and VERSTRAETE M. Platelet aggregating activity in neuraminidase-treated human cryoprecipitates : its correlation with factor VIII related antigen. *Br.J.Haemato.*, 26, 645-650, 1974. 38
168. VERWEIJ CL, HART M and PANNEKOEK H. Von Willebrand factor (vWF) pro-polypeptide is required for vWF multimer formation. *Thromb. Haemost.*, in press, 1987. 21
169. WAGNER DD, MARDER VJ. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells : processing steps and their intracellular localization. *J. Cell. Biol.*, 99, 2123-2130, 1984. 21
170. WAGNER DD, MAYADAS T, MARDER VJ. Initial glycosylation and acidic pH in the golgi apparatus are required for multimerization of von Willebrand factor. *J.Cell.Biol.*, 102, 1320-1324, 1986. 41
171. WEISS HJ, BAUMGARTNER HR, TSCHOPP TB, TURITTO VT, COHEN D. Correction by VIII of the impaired platelet adhesion to subendothelium in von Willebrand's disease. *Blood*, 51, 267-279, 1978a. 34

172. WEISS HJ, ROGERS J, BRAND H. Defective ristocetin-induced platelet aggregation in von Willebrand's disease and its connection by factor VIII. J.Clin.Invest., 52, 2697-2707, 1973. 27
173. WEISS HJ, TSCHOPP TB, BAUMGARTNER HR, SUSSMAN II, JOHNSON MM, EGAN JJ. Decreased adhesion of giant (Bernard Soulier) platelets to subendothelium. Further implications on the role of the von Willebrand factor in hemostasis. Am. J. Med., 57, 920-925, 1974. 12
16
174. WEISS HJ, TURITTO VT, BAUMGARTNER HR. Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood. I. Shear rate dependent decrease of adhesion in von Willebrand's disease and the Bernard Soulier Syndrome. J. Lab. Clin. Med., 92, 750-764, 1978b. 16
175. WEISS HJ, TURITTO VT, BAUMGARTNER HR. Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient glycoproteins IIb IIIa, and storage granules. Blood, 67, 322-330, 1986. 17
176. WEISS HJ, TURITTO VT, VICIC WJ, BAUMGARTNER HR. Effect of aspirin and dipyridamole on the interaction of human platelets with subendothelium. Studies using citrated and native blood. Thromb. Haemostas., 45, 136-141, 1981. 17
18
177. ZIMMERMAN TS, ABILDGAARD C and MEYER D. The factor VIII abnormality in severe von Willebrand's disease. N.Engl.J.Med., 301, 1307-1310, 1979. 37
178. ZIMMERMAN TS, DENT JA, RUGGERI ZB, NAMMINI LH. Subunit composition of plasma von Willebrand factor (cleavage is present in normal individuals, increased in IIa and IIb von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers) (type IIC, IID and IIE) J. Clin. Invest., 77, 947-, 1986. 28
179. ZIMMERMAN TS, RATNOFF OD, POWELL AE. Immunologic differentiation of classic hemophilia and von Willebrand's disease. J. Clin. Invest., 50, 244, 1971. 27
180. ZUCKER MB, KIM SJ, Mac PHERSON J, GRANT RA. Binding of factor VIII to platelets in the presence of ristocetin. Br. J. Haematol., 35, 535-549, 1977. 28
31

