

50376

1991

94

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES - ARTOIS

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : BIOLOGIE MOLECULAIRE

PAR

Bernard MERCIER



INTERET DE LA P.C.R. DANS L'ETUDE DES HEMOPHILIES A ET B ET DE LA MALADIE DE WILLEBRAND



PRESENTEE LE 15 AVRIL 1991 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

PRESIDENT : J. MONTREUIL
RAPPORTEURS : J. BEGUERET
A. PIERCE
EXAMINATEURS : S. BALL
J.J. HUART
C. MAZURIER

Le travail exposé dans ce mémoire a été réalisé dans le laboratoire de Recherche sur l'Hémostase du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille (Directeur : M^r le D^r J.J. Huart), sous la responsabilité de M^{me} C. Mazurier, Docteur ès Sciences.

REMERCIEMENTS

A Madame le Docteur Claudine MAZURIER

Vos travaux sur l'étude du FVIII/vWF plasmatique humain ont permis l'essor du laboratoire d'Hémostase Recherche du C.R.T.S. de Lille. La création en 1988 d'un laboratoire de biologie moléculaire vous a permis de poursuivre ces études par de nouvelles techniques. Je vous remercie de vos nombreux conseils et de m'avoir accordé votre confiance.

Par cette thèse je vous exprime ma profonde reconnaissance et mon amitié.

A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL

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

A Monsieur le Professeur Joel BEGUERET

C'est grâce à vous et à la confiance que vous m'avez accordée alors que j'étais étudiant en maîtrise de biologie cellulaire que j'ai pu réaliser un D.E.A. de biologie moléculaire dans le Laboratoire d'Analyses Médicales des Allées de Tourny à Bordeaux.

J'apprécie l'honneur que vous me faites aujourd'hui en acceptant de juger cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect.

A Madame le Docteur Annick PIERCE

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de cette thèse. Je vous exprime mes plus profonds remerciements.

A Monsieur le Professeur Steven BALL

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

A Monsieur le Docteur Jean Jacques HUART

Vous m'avez accordé votre confiance en m'engageant dans votre établissement. L'intérêt constant que vous avez témoigné pour le développement de la biologie moléculaire, malgré vos nombreuses occupations, a été pour moi un précieux encouragement.

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

A Monsieur le Professeur Maurice GOUEMAND

Vos connaissances dans le domaine de l'Hémostase et de l'Hématologie forcent mon admiration. Vos compétences, la rigueur de votre jugement scientifique, votre intérêt constant pour la recherche sont un encouragement important pour le laboratoire de recherche sur l'Hémostase.

Cette thèse est pour moi l'occasion de vous exprimer toute ma gratitude pour la confiance que vous m'avez accordée.

A Mademoiselle le Docteur Christine GAUCHER

Ces deux années de travail que nous avons partagées m'ont permis d'apprécier tes qualités de chercheur, ta franchise et ta serviabilité.

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

A Madame le Docteur Armelle PARQUET-GERNEZ

Cette thèse est pour moi l'occasion de vous exprimer toute ma reconnaissance pour nous avoir permis d'étudier certains de vos patients. Je vous exprime mes plus profonds remerciements pour cette collaboration.

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

Mademoiselle Sabine PEERE et Monsieur Denis HOGUET pour leur constante bonne humeur, pour l'aide qu'ils m'ont apportée ainsi que pour leur participation à ces études.

Toute l'équipe du laboratoire Hémostase Recherche pour son aide et sa sympathie

Le personnel du laboratoire Hémostase Analyses qui s'est chargé des prélèvements.

Monsieur Olivier FEUGEAS pour le soutien constant qu'il m'a apporté ainsi que pour m'avoir initié à l'informatique.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

GENERALITES

A - <u>RAPPEL SUR LA PHYSIOLOGIE DE L'HEMOSTASE</u>	5
1 - hémostase primaire	5
2 - coagulation	6
3 - fibrinolyse	6
B - <u>L'HEMOPHILIE A</u>	8
I - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	8
II - LE FACTEUR VIII	9
1 - biosynthèse	9
2 - fonction du facteur VIII	10
a - schéma de l'activation du facteur VIII par la thrombine	
b - inactivation du facteur VIII	
III - HEREDITE DE L'HEMOPHILIE A	13
1 - transmission	13
2 - définition des conductrices	13
3 - l'hémophilie sporadique	14
4 - cas de mosaïsme	15
5 - l'hémophilie féminine	15

IV - DIAGNOSTIC GENOTYPIQUE	15
1 - le gène du facteur VIII	17
2 - polymorphismes	20
a - polymorphismes intragéniques	
b - polymorphismes extragéniques	
3 - anomalies du gène du FVIII	21
a - délétions	
b - mutations ponctuelles	
C - <u>L'HEMOPHILIE B</u>	23
I - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	23
II - LE FACTEUR IX	25
III - HEREDITE	27
IV - DIAGNOSTIC GENOTYPIQUE	27
1 - le gène du facteur IX	27
2 - polymorphismes	27
a - polymorphismes intragéniques	
b - polymorphismes extragéniques	
3 - anomalies du gène du FIX	28
a - délétions ou insertions	
b - mutations ponctuelles	
D - <u>LA MALADIE DE WILLEBRAND</u>	29
I - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	29
II - TRANSMISSION	31
III - LE FACTEUR WILLEBRAND	31
1 - biosynthèse	31
2 - rôle	33
3 - interaction avec le facteur VIII	33
IV - DIAGNOSTIC GENOTYPIQUE	35

1 - le gène du facteur Willebrand	35
2 - polymorphismes	37
a - polymorphismes intragéniques	
b - polymorphismes extragéniques	
3 - anomalies du gène du vWF	38
a - délétions	
b - mutations ponctuelles	

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIELS ET METHODES

A - <u>EXTRACTION D'ADN ET D'ARN</u>	41
I - EXTRACTION MANUELLE D'ADN	41
II - EXTRACTION AUTOMATISEE	41
1 - extraction d'ADN	42
2 - extraction d'ARN	42
B - <u>"POLYMERASE CHAIN REACTION" (P.C.R.) ou</u> <u>AMPLIFICATION ENZYMATIQUE</u>	42
I - GENERALITES	42
II - LIMITES DE LA P.C.R.	43
III - OPTIMISATION	45

1 - choix des "amorces"	45
2 - qualité des "amorces"	48
3 - température de dénaturation	48
IV - CONDITIONS DE P.C.R.	48
V - CONDITIONS SPECIALES DE P.C.R.	49
VI - P.C.R. A PARTIR D'ARN	50
C - <u>ANALYSE DES FRAGMENTS AMPLIFIES</u>	51
I - ETUDE PAR DIGESTION PAR DES ENZYMES DE RESTRICTIONS	51
II - ETUDE PAR SEQUENCAGE	51
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> RESULTATS </div>	
A - <u>AMPLIFICATION A PARTIR DE SANG, SANS EXTRACTION DE L'ADN</u>	53
I - METHODE	53
II - DISCUSSION	53
B - <u>ETUDE DES HEMOPHILIES</u>	57
I - ETUDES FAMILIALES	57
1 - hemophilie A :	57
a - généralités	
b - polymorphisme Bcl 1	

2 - hemophilie B :	63
a - polymorphisme Dde 1	
b - polymorphisme Taq 1	
c - polymorphisme Hha 1	
3 - discussion	69
a - intérêts de la P.C.R.	
b - limites de la P.C.R.	
c - stratégie utilisée dans le laboratoire	
d - conclusion	
II - RECHERCHE D'ANOMALIES DES GENES DU FACTEUR VIII	
ET DU FACTEUR IX	74
1 - hemophilie A	74
2 - hemophilie B	75
a - étude du patient A.O.	
b - étude du patient P.J.	
3 - amplification à partir d'ARN	78
4 - discussion	79
C - <u>ETUDE DE LA MALADIE DE WILLEBRAND</u>	83
I - POLYMORPHISME Msp I DE L'INTRON 19	83
1 - mise en évidence et caractérisation	83
2 - discussion	84
II - CARACTERISATION DU POLYMORPHISME DE L'INTRON	40
1 - étude de ce polymorphisme	87
2 - résultats	88
3 - application à l'étude de familles de vWD	97
a - type I : famille S.	
b - type IIB : famille M.	
c - type IIC : famille B.	
d - type II"Normandy"	
e - type III : famille W.	

4 - autres applications potentielles	107
5 - discussion	109
III - CARACTERISATION DE VARIANTS DE TYPE "NORMANDY"	
1 - description	114
2 - étude de la patiente B.G.	115
a - données phénotypiques	
b - résultats	
3 - étude du patient D.S.	136
a - données phénotypiques	
b - résultats	
4 - étude de la patiente P.C.	137
a - données phénotypiques	
b - résultats	
5 - étude de la patiente M.M.	139
a - données phénotypiques	
b - résultats	
6 - amplification à partir d'ARN	140
7 - discussion	140
CONCLUSION	149
BIBLIOGRAPHIE	153

ANNEXE : liste des "amorces"

ABREVIATIONS

Ac	: anticorps
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNc	: ADN complémentaire
ARN	: acide ribonucléique
Da	: dalton
F	: facteur
FIX	: facteur IX
FIX:C	: activité du facteur IX
FIX:Ag	: antigène du facteur IX
FVIII	: facteur VIII
FVIII:C	: activité du facteur VIII
FVIII:Ag	: antigène du facteur VIII
kb	: kilobases
kDa	: kilodaltons
NT	: nucléotide
pb	: paire de bases
PCR	: "polymerase chain reaction" ou amplification enzymatique
RFLP	: "restriction fragment length polymorphism" ou polymorphisme de longueur de fragment de restriction
vWD	: "von Willebrand disease" ou maladie de Willebrand
vWF	: "von Willebrand factor" ou facteur von Willebrand
vWF:Ag	: antigène du facteur Willebrand
VNTR	: "variable number of tandem repeats"

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Des progrès considérables ont été réalisés ces 15 dernières années en Biologie Moléculaire. Ainsi, grâce à de nouvelles techniques, plusieurs gènes ont pu être localisés, clonés, puis séquencés. Des gènes responsables de la synthèse de protéines intervenant dans la coagulation ont été séquencés, parmi ceux-ci, le gène du facteur VIII, le gène du facteur IX et, plus récemment, le gène du facteur Willebrand. Ces facteurs, et donc les gènes correspondants, sont impliqués dans les trois maladies hémorragiques héréditaires les plus fréquentes : la maladie de Willebrand, l'hémophilie A (gène du facteur VIII) et l'hémophilie B (gène du facteur IX).

Le diagnostic de ces maladies reposait uniquement, pendant de nombreuses années, sur les dosages fonctionnels ou immunologiques de ces facteurs. La caractérisation directe (anomalie génétique) ou indirecte (par des polymorphismes de longueur de fragment de restriction : RFLPs) du gène responsable de la maladie chez un malade permet d'étudier la transmission de ce gène anormal au sein d'une famille. De plus, la caractérisation des anomalies génétiques permet indirectement de préciser les relations existant entre la structure et la fonction hémostatique de

ces facteurs. En outre, grâce aux techniques de biologie moléculaire, du facteur VIII recombinant est maintenant produit par génie génétique et des essais thérapeutiques chez l'homme sont en cours.

Dans ce mémoire nous présenterons tout d'abord une étude bibliographique concernant principalement les gènes des facteurs VIII (FVIII), IX (FIX) et Willebrand (vWF). Puis, après avoir exposé les techniques développées dans le laboratoire pour effectuer nos travaux, et particulièrement la PCR, nous présenterons et discuterons les résultats obtenus dans les deux axes de recherche suivants :

- études familiales des hémophilies et de la maladie de Willebrand.

- caractérisation des anomalies génétiques responsables de ces maladies.

Une partie de ce travail a été rapportée dans 6 mémoires insérés dans la partie "résultats" de cette thèse. Certains sont déjà publiés (1,2) ou acceptés pour publication (3,4,6).

1 MERCIER B, GAUCHER C, FEUGEAS O, MAZURIER C. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. Nucleic Acids Research, 18, 5908, 1990. p 56

2 MERCIER B, GAUCHER C, MAZURIER C. An Msp I polymorphism in the vWF gene. Nucleic Acids Research, 18, 7467, 1990.

p 86

3 GAUCHER C, JORIEUX S, MERCIER B, OUFKIR D, MAZURIER C. The "Normandy" variant of von Willebrand's disease : characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene. Blood, 1991, sous presse. p 118 à 134

4 MERCIER B, GAUCHER C, MAZURIER C. Detection of the Taq I polymorphism of the factor IX gene by PCR. Thrombosis Research, sous presse. p 67 à 68

5 MERCIER B, GAUCHER C, MAZURIER C. A multi-allelic polymorphism of the von Willebrand factor gene detected by PCR : characterization of 94 alleles in 101 unrelated individuals. Nucleic Acids Research, soumis. p 95 à 96

6 MERCIER B, GAUCHER C, MAZURIER C. Improvement in the analysis of the Bcl I polymorphism of the factor VIII gene by PCR : introduction of a constant Bcl I site in one of the primers as control of digestion. Thrombosis Research, soumis. p 60 à 62

GENERALITES

A - RAPPEL SUR LA PHYSIOLOGIE DE L'HEMOSTASE

Le terme hémostase regroupe les différents mécanismes qui assurent la prévention des saignements spontanés et l'arrêt des hémorragies en cas de rupture de la continuité de la paroi endothéliale vasculaire.

Bien que les mécanismes très complexes aboutissant à l'arrêt des hémorragies soient très fortement imbriqués, il est convenu de distinguer les phases suivantes :

1 - Hémostase primaire :

C'est l'ensemble des phénomènes responsables de la formation d'un thrombus plaquettaire dans la brèche vasculaire. Elle met en jeu le vaisseau, les plaquettes et un facteur plasmatique essentiel : le facteur Willebrand. Déclenchée par une lésion vasculaire, elle entraîne une vasoconstriction réflexe. La mise à nu des structures sous-endothéliales dans la lésion déclenche l'adhésion puis l'agrégation des plaquettes. L'agrégation des plaquettes s'accompagne d'un changement de leur morphologie et de la libération d'un certain nombre de substances contenues dans des granules intraplaquettaires (ADP, sérotonine,...).

2 - Coagulation

Induite par le contact du sang avec le sous-endothélium ou des substances libérées par lésion des tissus (facteur tissulaire), la coagulation intervient pour consolider le thrombus plaquettaire et réaliser une hémostase définitive. La coagulation, constituée d'une série de réactions enzymatiques en cascade (Fig. 1, p. 7), se déroule en trois étapes : production de prothrombinase, thrombinoformation et fibrinoformation. La formation de prothrombinase se fait selon deux voies : l'une est dite extrinsèque ou "exogène" car elle fait appel à un facteur étranger au sang : le facteur tissulaire, l'autre est appelée "intrinsèque" ou "endogène" car elle ne nécessite que le concours de facteurs plasmatiques et plaquettaires.

3 - Fibrinolyse

La fibrinolyse physiologique intervient ensuite pour assurer la reperméabilisation du vaisseau, en dégradant le caillot de fibrine grâce à la formation de la plasmine régulée par des activateurs et inhibiteurs de la transformation du plasminogène en plasmine.

Parmi les maladies hémorragiques constitutionnelles dues à un déficit quantitatif ou qualitatif d'un facteur de coagulation, nous nous sommes attachés aux plus fréquentes : la maladie de Willebrand, l'hémophilie A et l'hémophilie B.

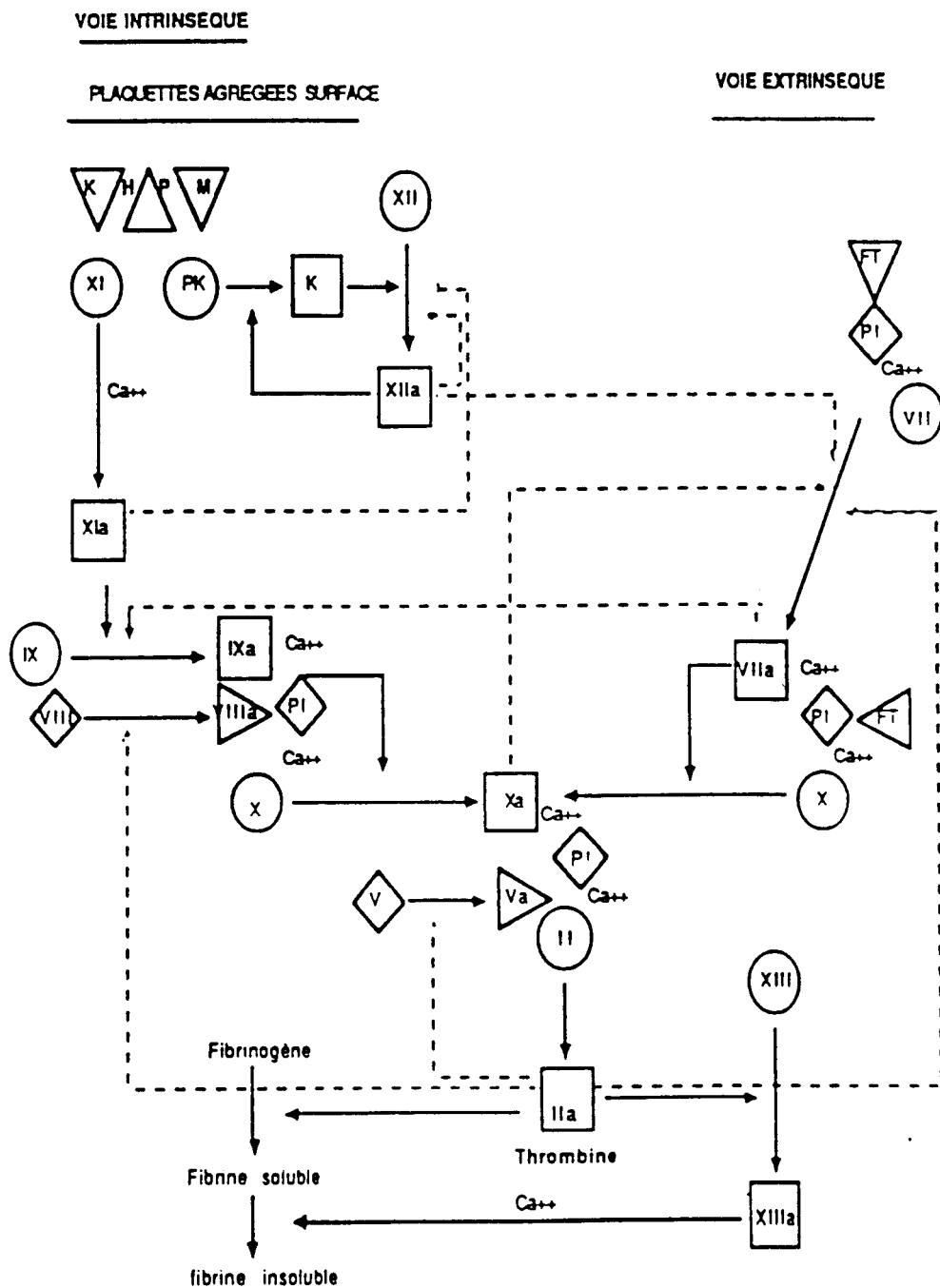


Figure 1 : Schéma de la coagulation

O Zymogène, □ Enzyme ▷ protéines co-facteur des réactions enzymatiques (représentées sous forme inactive), ◇ phospholipides, KHPM: kininogène de haut poids moléculaire, PK: prékallikréine, K: kallikréine, FT: facteur tissulaire.

Les mécanismes de contrôle rétro-actif et les interférences entre systèmes intrinsèque, extrinsèque et hémostase primaire sont indiqués en pointillés.

B - L'HEMOPHILIE A

L'hémophilie A est due à un déficit héréditaire du facteur VIII (FVIII) qui intervient dans la voie intrinsèque de la coagulation sanguine. L'incidence de l'hémophilie A est estimée dans le monde à 1 pour 5 000 garçons.

Souvent suspectée sur des manifestations cliniques spécifiques (hémorragies articulaires...) et sur une histoire hémorragique familiale évoquant une affection récessive liée au sexe, cette pathologie est diagnostiquée sur les critères phénotypiques suivants :

I - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

L'hémophilie est envisagée en présence d'un allongement du temps de coagulation et du temps de céphaline activé. La maladie est confirmée par le dosage de l'activité coagulante du facteur VIII (F VIII:C)

L'hémophilie A existe sous trois formes cliniques selon l'activité résiduelle du F VIII:C :

* les formes sévères :

F VIII:C < 1%

* les formes modérées :

1% < F VIII:C < 5%

* les formes mineures :

5% < F VIII:C < 20%

L'activité des facteurs de coagulation est mesurée par rapport à un pool de plasmas citratés normaux qui contient par définition 100 unités / dl (1 U / ml) ou 100% de chacun des facteurs.

On trouve dans le plasma d'environ 5 à 20% des hémophiles une protéine F VIII anormale, détectée par des techniques immunologiques (FVIII:Ag), n'ayant pas d'activité biologique mais possédant certains déterminants antigéniques du facteur VIII normal. Ces hémophiles sont dit A + ou CRM + ("Cross Reacting Material").

Environ 15% des hémophiles majeurs s'immunisent contre le FVIII après injections de sang ou de concentrés plasmatiques, on dit qu'ils ont un anticoagulant détecté par son activité inhibitrice vis à vis du F VIII:C.

II - LE FACTEUR VIII

1 - Biosynthèse :

Bien que la principale source de FVIII plasmatique soit le foie (12,42,137), l'ARN messager du facteur VIII a été mis en évidence au niveau de nombreux tissus : rate, reins, nodules lymphatiques, pancréas, muscles, placenta (143).

La purification du facteur VIII humain a permis de déterminer une partie de la séquence d'acides aminés de la molécule. La séquence nucléotidique a été déterminée grâce au clonage du gène du FVIII (45,133). La protéine, composée de 2351 acides aminés, possède une séquence signal hydrophobe de 19 acides aminés. Plusieurs domaines ont été identifiés : la chaîne lourde est constituée des domaines A1-A2, la chaîne légère des domaines A3-C1-C2 (Fig. 2, p. 11). Elles sont séparées par un domaine unique (acides

aminés 717-1648) appelé domaine B qui n'a que 14 % d'homologie avec le domaine B du facteur V. Les trois domaines A présentent 30 % d'homologie de séquence entre eux et avec la céruloplasmine, protéine de transport du cuivre sérique, et 40 % d'homologie avec les 3 domaines A du facteur V. Les domaines C du FVIII montrent 20 % d'homologie entre eux et avec la discoïdine, une lectine de *Dictyostelium*. Cette homologie suggère que les domaines C correspondraient au site de fixation des phospholipides.

2 - Fonction :

Dans le plasma, à l'état normal, le FVIII est lié au facteur Willebrand sous forme d'un complexe non covalent appelé FVIII/vWF. Le vWF transporte le FVIII et le positionne à la surface des plaquettes au site de la lésion. Une fois placé sur les plaquettes, le FVIII séparé du vWF forme un complexe avec le FIX activé, le FX, les phospholipides de surface et l'ion calcium. Ce complexe est responsable de l'activation du facteur X en facteur X activé (Fig. 1, p. 7). En l'absence du FVIII, l'activation du FX → FX activé se fait beaucoup plus lentement.

a - Schéma de l'activation du FVIII par la thrombine. (voir Fig. 2, p. 11 et Fig. 3, p. 12)

Le facteur VIII, synthétisé sous forme d'un polypeptide précurseur de 2351 acides aminés, circule sous forme d'une série d'hétérodimères formés d'une chaîne légère de 80 kDa et d'une chaîne plus lourde variable, de 90 à 200 kDa. L'activation commencerait par un processus de

protéolyse dû à la thrombine ou au facteur X activé entraînant le clivage de l'arginine 740 de la chaîne de poids moléculaire variable pour donner une chaîne lourde uniforme de 90 kDa correspondant aux domaines A1-A2. Elle est suivie par deux clivages successifs, l'un au niveau de l'arginine

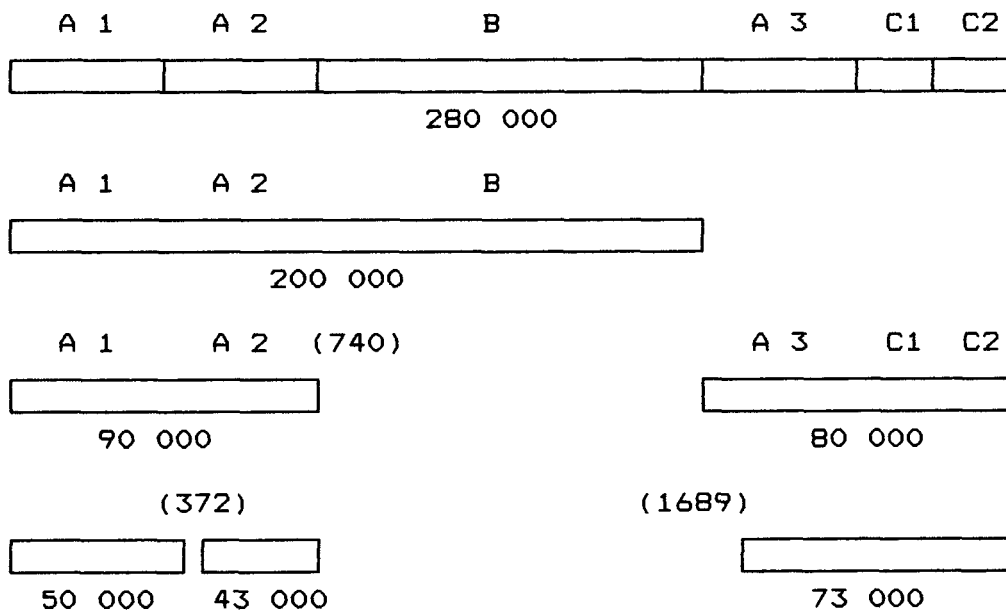


Fig. 2 : schéma de l'activation du facteur VIII par la thrombine.
372,740,1689 indique les numéros des acides aminés où se situent les sites de clivage par la thrombine

372, à la jonction de la première région acide et du second domaine A donnant des fragments de 50 kDa et 43 kDa ; l'autre au niveau de l'arginine 1689 dans la chaîne légère de 80 kDa, à la jonction du deuxième domaine acide et du domaine A3, donnant un fragment de 73 kDa (28,132,110) (Fig. 3, p. 12). Le domaine B, clivé durant l'activation, ne semble pas avoir de rôle dans la coagulation plasmatique (13,29,102,105).

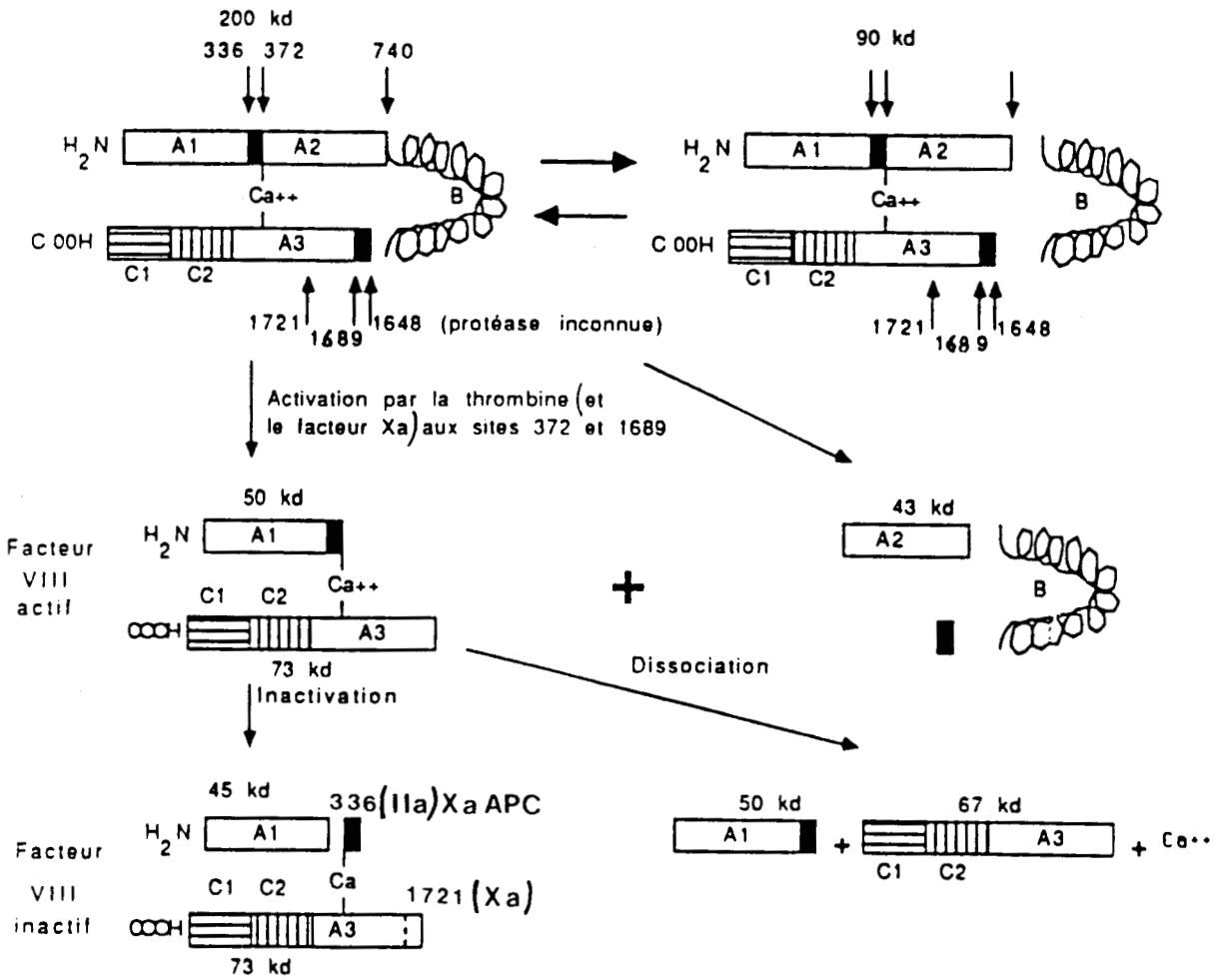


Figure 3 : Modèle d'activation et d'inactivation du facteur VIII
D'après Pittman et Kauffman(1988)

b - Inactivation du facteur VIII

L'inactivation du F VIII semble résulter du clivage par le facteur X activé ou la protéine C activée (PCA) au niveau de l'arginine 336 du fragment de 50 kDa entre le domaine A1 et la première région acide, qui donne un fragment de 45 kDa (Fig. 3, p. 12) (110).

III - HEREDITE DE L'HEMOPHILIE A

Le gène du FVIII étant situé sur le chromosome X, la transmission de cette maladie est liée au sexe et est de type récessive.

1 - Transmission :

Les garçons hémophiles ont hérité du chromosome X morbide de leur mère et du chromosome Y du père. Leurs mères sont dites "conductrices" puisqu'elles ont un chromosome X normal et un chromosome X morbide, sauf dans le cas de néomutations.

Lorsque un homme est hémophile, tous ses garçons sont normaux et toutes ses filles sont obligatoirement conductrices.

Les filles d'une femme conductrice sont soit normales, soit conductrices selon qu'elles héritent du chromosome sain ou du chromosome morbide de leur mère.

2 - Définition des conductrices :

Les conductrices d'hémophilie sont classées en deux groupes :

- les conductrices obligatoires qui sont :

- * les filles d'hémophiles.
- * les mères d'au moins deux enfants hémophiles.
- * les mères d'un enfant hémophile apparentées à des hémophiles du côté maternel.

- les conductrices potentielles, qui sont :

- * les soeurs d'hémophiles.
- * les filles de conductrices.
- * les femmes apparentées à des hémophiles du côté maternel mais qui n'ont pas d'enfant hémophile.
- * les mères d'un seul enfant hémophile sans antécédents familiaux (cas d'hémophilie sporadique).

3 - L'hémophilie sporadique :

Elle est définie dans les familles où un seul membre est atteint. Il peut s'agir :

- * soit d'une mutation qui est restée silencieuse pendant plusieurs générations (le gène anormal n'étant transmis à aucun garçon).

- * soit d'une mutation " de novo " :

Cette mutation peut s'être produite :

- dans l'ovule fécondé dont est issu l'hémophile, dans ce cas les autres enfants seront normaux.

- dans l'ovule fécondé dont est issue la mère de l'hémophile, celle-ci est alors conductrice.

Ces mutations "de novo" représentent environ 30 % des cas d'hémophilie A (37).

4 - Cas de mosaïsme

De rares cas de mosaïsme ont été décrits. Il s'agit en fait d'une mutation qui s'est produite très tôt durant le développement de l'embryon. Dans ce cas une mère de deux enfants hémophiles, sans antécédants familiaux, n'est pas conductrice obligatoire. En effet, dans le cas de mosaïsme des cellules germinales les ovules forment une population de plusieurs type de cellules dont la majorité sont normales mais dont certaines peuvent être morbides.

5 - L'hémophilie féminine :

Dans des cas très rares, l'hémophilie peut s'observer chez une femme. Il s'agit alors :

- * de femmes n'ayant qu'un seul chromosome X (syndrome de Turner), celui-ci étant morbide.

- * de femmes homozygotes pour le chromosome anormal (cas de mariage consanguin ou de mariage entre familles d'hémophiles).

- * de femmes dont le chromosome X normal est complètement inactivé (phénomène de Lyonisation extrême) (82).

IV - DIAGNOSTIC GENOTYPIQUE

Le clonage des gènes du facteur VIII (45,133) et la caractérisation de marqueurs génétiques liés à ce gène ont rendu possible le dépistage génotypique de l'hémophilie A chez les conductrices, mais aussi chez le foetus. Deux types de méthodes peuvent être utilisés :

* méthodes directes :

Elles reposent sur la détection de l'anomalie génétique responsable de l'hémophilie, mais ne sont utilisables que dans les rares cas où cette anomalie a pu être caractérisée.

* méthodes indirectes :

Elles consistent en l'analyse de Polymorphismes de Longueurs de Fragments de Restriction, ou RFLPs, situés soit dans le gène (intragénique), soit à proximité du gène (extragénique).

Une variation de séquence à un endroit donné de l'ADN est appelée polymorphisme si elle respecte les règles suivantes :

- elle doit être transmise selon les lois de Mendel.
- elle ne doit jamais être responsable d'une maladie.

Un polymorphisme peut être bi-allélique ou multi-allélique. L'informativité, ou probabilité d'hétérozygotie, d'un polymorphisme dépend du nombre d'allèles :

* pour un polymorphisme bi-allélique :

L'informativité (i) est maximale (50%) lorsque les deux allèles ont la même fréquence (50%). Lorsque les deux allèles n'ont pas la même fréquence, on peut calculer cette informativité d'après la formule :

$$(a + b)^2 = 1 \quad \text{loi de Hardy Weinberg}$$

$$\text{d'où : } i = 2ab = 1 - (a^2 + b^2)$$

i = informativité = fréquence des hétérozygotes

a et b = fréquences de chaque allèle.

* pour un polymorphisme multi-allelique :

La fréquence des hétérozygotes est alors calculée selon la formule :

$$(a + b + c + \dots + n)^2 = 1$$

1 - Le gène du facteur VIII

Le gène du FVIII, localisé sur le bras long du chromosome X, en position q28 (Fig. 4, p. 18), a une longueur de 186 kb soit 0,1 % du chromosome X (45,133). Les séquences codantes sont réparties en 26 exons dont la taille varie de 69 pb à 262 pb, à l'exception des exons 14 et 26 qui font 3 et 2 kb respectivement (Fig. 5, p. 19). Le reste du gène, 177 kb, est constitué de séquences non codantes : 25 introns de taille très inégales (de 200 pb à 32 kb).

Le gène du FVIII est transcrit en un ARN messager de 9 kb (45,133) dont le site d'initiation est situé en position -170. La séquence 3' non codante comprend 1805 nucléotides.

L'homologie de séquence entre le FVIII, le FV et la céruloplasmine suggère que ces gènes dérivent d'un gène ancestral commun.

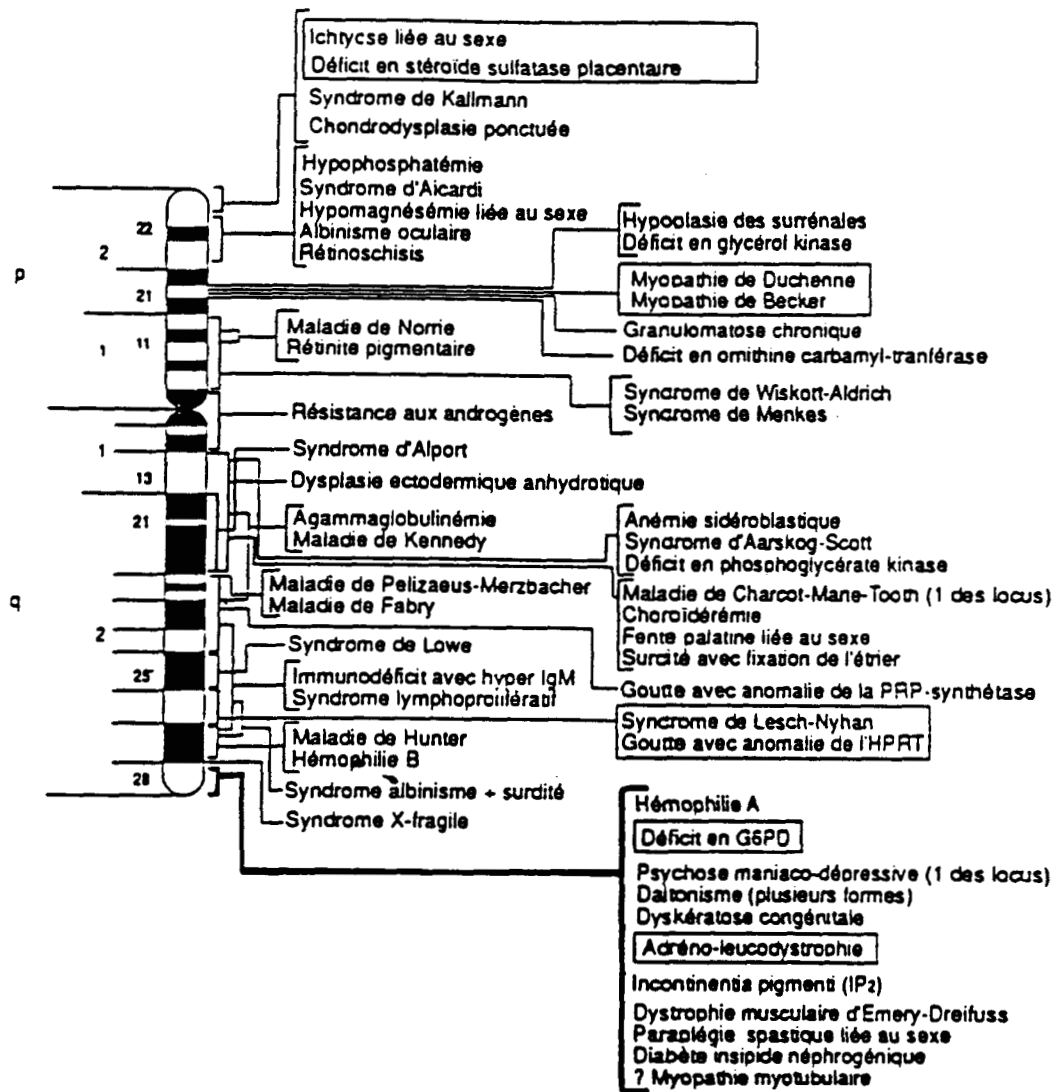


Figure 4 : Carte des locus morbides du chromosome X
 (d'après J.C. Kaplan et M. Delpech, 1989.)

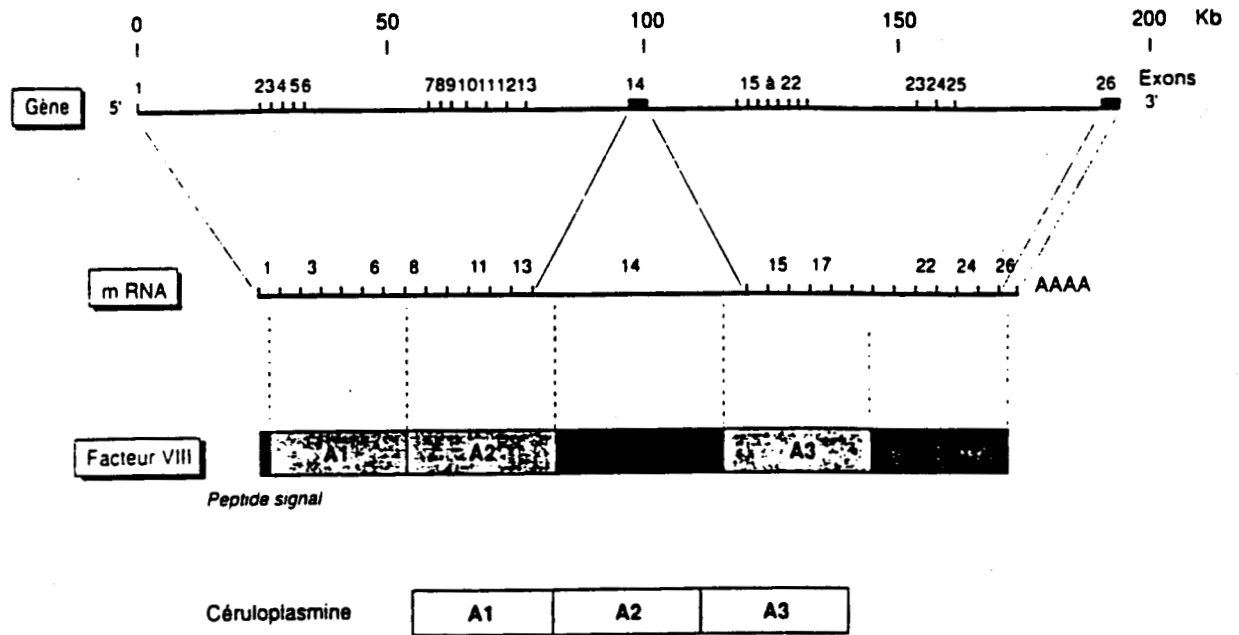


Figure 5 : Structure respectives des gènes, du messenger et de la protéine facteur VIII; homologie avec la céruloplasmine (d'après JC. Kaplan et M. Delpech , 1989.)

2 - Polymorphismes :

a - Polymorphismes intragéniques

Jusqu'à présent 5 polymorphismes intragéniques, tous bi-alléliques, ont été décrits (les chiffres indiquent la fréquence de chaque allèle dans une population de type Caucasienne) :

- polymorphisme Bcl I, intron 18 : 0,21/0,79 (46)
- polymorphisme Xba I, intron 22 : 0,41/0,59 (142)
- polymorphisme Bgl I, intron 25 : 0,20/0,80 (2)
- polymorphisme Hind III, intron 19 : 0,70/0,30 (1)
- polymorphisme Msp I, en 3' non codant 0,32/0,68 (152)

Les polymorphismes Bcl I et Xba I sont les plus couramment utilisés en routine : ils permettent la détection de 60 à 70 % des conductrices. L'intérêt des polymorphismes Bgl I et Hind III est limité car ils sont en déséquilibre de liaison avec le polymorphisme Bcl I.

b - Polymorphismes extragéniques

Deux polymorphismes extragéniques ont été décrits. Le premier, situé au locus DXS52 et révélé par la sonde ST 14 (103), est très polymorphe avec sa structure de "VNTR" (variable number tandem repeat). Le deuxième situé au locus DXS15 est bi-allélique (54). Ces polymorphismes sont situés en 3' du gène, avec un risque de recombinaison estimé entre 2 et 5 %. Ce risque correspond à la probabilité de recombinaison entre le gène du FVIII et le polymorphisme étudié. Par définition, cette probabilité est de 1 % pour une distance de 1 cM. Une recombinaison située

entre le polymorphisme extragénique et le gène étudié peut entraîner, si elle n'est pas décelée, une erreur de diagnostic lors d'une étude familiale.

3 - Anomalies du gène du FVIII

La grande taille du gène du FVIII constitue un obstacle à son séquençage systématique chez tous les hémophiles A en vue d'identifier l'anomalie responsable de la maladie. Néanmoins, des délétions et des mutations ponctuelles ont été caractérisées, le plus souvent par la technique de Southern (121) et plus récemment par P.C.R. .

a - Délétions ou insertions :

Le tableau 1 page 22 montre la localisation et la taille des délétions identifiées chez des hémophiles sévères et chez un hémophile modéré (148). Un certain nombre d'insertions dans le gène du facteur VIII ont aussi été caractérisées (37).

b - Mutations ponctuelles :

La majorité des mutations ponctuelles ont été détectées en utilisant l'enzyme de restriction Taq I dont le site de reconnaissance TCGA contient un dinucléotide CpG. Ce dinucléotide, apparemment à haut risque, "point chaud", de mutation est appelé "hot spot" (6,20,124b). En effet lorsque celui-ci est méthylé, toute désamination ultérieure de la cytosine méthylée transforme celle-ci en thymine, transition non reconnue par les systèmes de réparation de l'ADN. Ainsi, par exemple, le codon CGA

Exons délétés	Taille (kb)	Inhibiteur	Réf
11-19	60	+	3
23-25	39	+	46
26	22	-	"
23-26	-	+	23
1-26	210	-	15
1-22	127	+	79
6	7	-	148
14	2.5	-	"
24-25	17	-	"
23-25	16-25	-	"
22	5.5	-	"
26	>2	-	"
3	1.7-2	-	56
7-10	15-20	+	"
26		-	"
14	2.3-3	?	"
15-18	13	+	7
1	>2	-	153
2-3	9-12	-	"
2-13	60	+	"
4-25	>133	-	"
7-14	40-56	-	"
26	4	-	"
15-18	15	+	57
14	2-5	-	"
14	12-14	+	"
1-5	>35	-	"
26		-	10
14	6	+	95
14	2.5	?	145
6	10	-	77
6	3-6	-	"
5-6	2.5-10	-	"
1-26	210	+	16
7-22	110	+	"
19-21	4.7	+	93
3-5	11.5	-	"
14-21	50	+	"
1-6	>55	+	"
5-13	57	+	"

Tableau 1 : Délétions identifiées sur le gène du FVIII.

codant pour l'arginine est transformé en codon stop TGA ou en codon CAA codant pour la glutamine selon que la mutation se produit sur le brin codant ou sur le brin non codant (Fig. 6, p. 24). Les diverses mutations identifiées à ce jour ont été répertoriées dans différents articles (2,37,38,76,124b, 144).

C - L'HEMOPHILIE B

L'hémophilie B est due à un déficit héréditaire du facteur IX (FIX) qui intervient également dans la voie intrinsèque de la coagulation sanguine (Fig. 1, p. 7). L'incidence de l'hémophilie B est estimée dans le monde à 1 pour 30 000 garçons.

I - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Les manifestations cliniques sont les mêmes que celles décrites pour l'hémophilie A. La maladie est confirmée par le dosage de l'activité coagulante du facteur IX (FIX:C).

Dans l'hémophilie B on distingue également trois formes, sévère (FIX <1%), modérée (1% < FIX:C < 5%) et mineure (5% < FIX:C < 20%), selon l'activité résiduelle du FIX:C

On trouve également dans le plasma de certains hémophiles B une protéine FIX anormale, détectée par des techniques immunologiques (FIX:Ag). Cette protéine n'a pas d'activité biologique mais possède certains déterminants

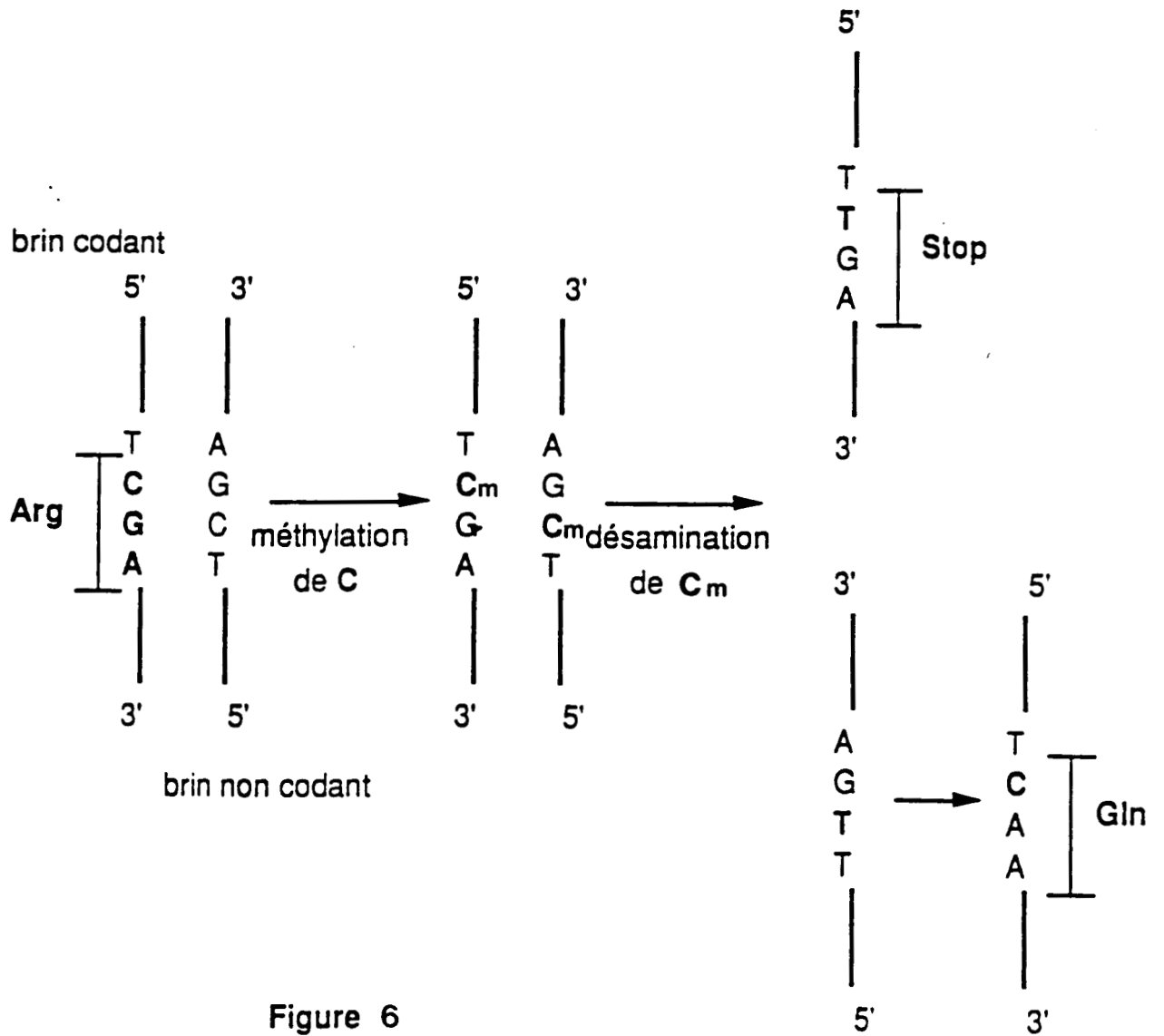


Figure 6

Mécanisme de la mutation ponctuelle du dinucléotide CpG par désamination de la cytosine méthylée (C_m).

antigéniques du FIX normal. Ces hémophiles sont dit B + ou CRM +.

Environ 3% d'hémophiles B s'immunisent contre le FIX après injections répétées de sang ou de concentrés plasmatiques, on dit qu'ils ont un anticoagulant détecté par son activité inhibitrice vis à vis du FIX:C.

II - LE FACTEUR IX

Le facteur IX est une glycoprotéine plasmatique de 415 acides aminés. Le FIX peut être activé par les voies intrinsèques (protéolyse par le FXI activé) ou par la voie extrinsèque (protéolyse par le FVII activé) (Fig. 1, p. 7).

Lors de l'activation du FIX, la protéine est clivée en une chaîne légère de 145 acides aminés et une chaîne lourde de 235 acides aminés restant reliées entre elles par des ponts di-sulfure. Le FIX activé permet l'activation du FX en présence de calcium, de phospholipides et du FVIII activé comme cofacteurs. Plusieurs domaines ont été localisés sur le FIX (38b) (Fig. 7, p. 26) :

* domaine "gla" : il contient 12 acides carboxy-glutamique. Ces acides aminés sont impliqués dans la fixation au calcium nécessaire pour son activité coagulante.

* domaines EGF : le FIX présente 2 domaines contigus de type "Epidermal Growth Factor". Ce type de domaine, retrouvé dans d'autres facteurs de coagulation (FVII, FX, FXII et protéine C), pourrait être impliqué dans l'interaction du facteur IX avec la surface cellulaire.

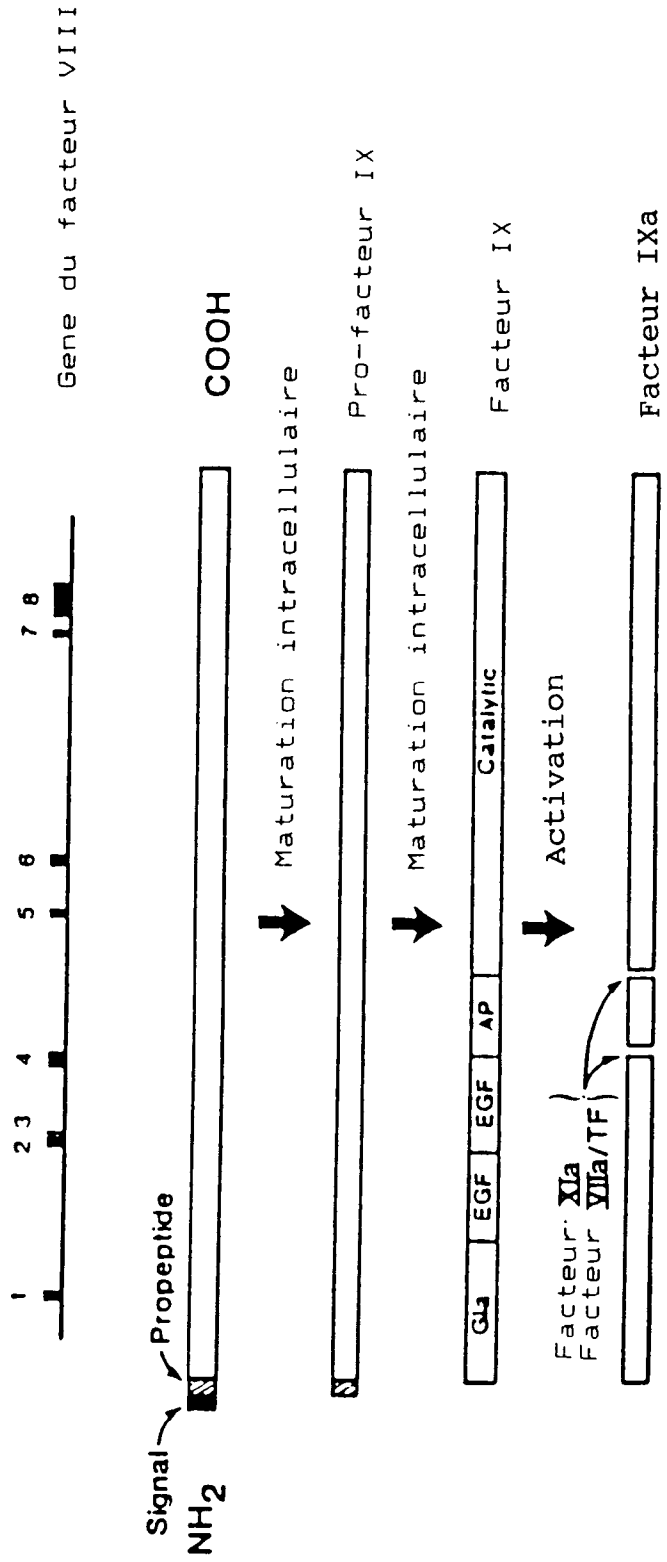


Fig 7 : structure du gène du FIX, du précurseur et de la protéine mature.

* domaine AP ("activation peptide") : domaine dont la libération est nécessaire pour l'activation du FIX. Le clivage a lieu au niveau des liaisons : Arg 145 - Ala 146 et Arg 180 - Val 181.

* domaine catalytique : il contient le domaine "serine protéase" appelé ainsi car il supporte l'activité endoprotéasique, ayant une sérine dans son site actif, s'exerçant sur le FX.

III - HEREDITE

La transmission de l'hémophilie B est identique à celle décrite pour l'hémophilie A (pages 13 à 15).

IV - DIAGNOSTIC GENOTYPIQUE

1 - Le gène du facteur IX

Le gène du FIX, d'une longueur d'environ 34 kb (147), est localisé sur le bras long du chromosome X, en position centromérique (q27) par rapport au gène du FVIII (Fig. 4, p. 18). Les séquences codantes sont réparties en 8 exons de tailles inégales, de 25 pb à 546 pb (Fig. 7, p. 26). La séquence complète du gène a été déterminée (147). L'ARN messager, comprenant 2802 nucléotides, code pour une protéine de 415 acides aminés. La séquence 3' non traduite comprend 1415 nucléotides.

2 - Polymorphismes

a - Polymorphismes intragéniques

Plusieurs polymorphismes intragéniques bi-alléliques ont été décrits (les chiffres indiquent la

fréquence de chaque allèle dans une population de type Caucasienne) :

polymorphisme Dde I, intron a :	0,24/0,76	(140)
polymorphisme Taq I, intron d :	0,65/0,35	(39)
polymorphisme Xmn I, intron c :	0,71/0,29	(140)
polymorphisme Msp I, intron d :	0,22/0,78	(36)
polymorphisme Mnl I, exon f :	0,36/0,64	(51)
polymorphisme BamHI, intron c :	0,87/0,13*	(26)
polymorphisme Msp I,	0,20/0,80	(14)

* : population de type Noire Américaine

b - Polymorphisme extragénique

Un polymorphisme extragénique situé à 8 kb en 3' du gène du facteur IX a été décrit (141). Ce polymorphisme est révélé, après amplification enzymatique, par digestion par l'endonucléase de restriction Hha I. Les auteurs estiment que le risque de recombinaison entre ce polymorphisme et le gène du facteur IX est négligeable (inférieur à 0,1 %). Un second polymorphisme extragénique bi-allélique, détecté par l'enzyme Sst I, situé au locus DXS99, a été décrit (97). Enfin 2 autres polymorphismes situés aux loci DXS98 et DXS100 ont été rapportés (12b,136).

3 - Anomalies du gène du facteur IX

La taille relativement peu importante de la séquence codante du gène du FIX permet son séquençage. De nombreuses équipes ont ainsi caractérisé diverses anomalies

(mutations ponctuelles, délétions, insertions) responsables de la maladie chez de nombreux patients.

a - délétions ou insertions

Les délétions ou insertions identifiées à ce jour ont toutes été répertoriées dans deux articles parus en 1990 (41,131).

b - mutations ponctuelles

L'ensemble des mutations identifiées sont répertoriées (41), mais quelques mutations ont été décrites depuis la parution de cet article (69,70,118,129). Ainsi, plus de 270 anomalies du gène du facteur IX ont été jusqu'à présent caractérisées.

D - LA MALADIE DE WILLEBRAND

La fréquence des anomalies du vWF est d'environ 1/100 (113). Bien que de nombreuses formes mineures de la maladie de Willebrand ne soient pas symptomatiques c'est cependant la maladie hémorragique constitutionnelle la plus fréquente. Les formes sévères de la maladie sont néanmoins rares, leur fréquence est d'environ 0,16/10⁶ en France(86).

I - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Les patients atteints de maladie de Willebrand (vWD) sont classés en trois types selon les résultats de certaines analyses biologiques (voir tableau 2 page 30).

La fréquence relative de chacun de ces types est

variable:	type I	: 70 à 85 %
	type II	: 10 à 20 %
	type III	: < 10 %

		Type I	Type II	Type III
Caractéristique du vWF plasmatique		anomalie quantitative	anomalie qualitative	absence
Temps de saignement		↗	↗	↗
Agrégation à la ristocétine		↓ ○	↓ ○ ou ↗	○
vWF:Ag		↓	↓ ou N	○
vWF:RCo		↓	↓ ou N	○
F VIII:C		↓	↓ ou N	< 10 U/dl
Etude électrophorétique	% HPM	N	↓	-
	unité multimérique	N	variable selon le sous-type	-

Tableau 2 : Classification de la maladie de Willebrand (HPM : pourcentage de formes de poids moléculaires élevés)

sous-type	II A	II B	II C
vWF:RCo	↘	↘ ou N	↘
Etude électrophorétique du vWF	pas de formes HPM et IPM du vWF plasmatique et plaquettaire	pas de forme HPM du vWF plasmatique vWF plaquettaire normal	pas de formes HPM du vWF plasmatique et plaquettaire. augmentation du protomère. diminution des "sous-bandes".
agrégation à la ristocétine	↘	↗ (à faible dose)	↘
transmission	dominante	dominante	récessive

Tableau 3 : Caractéristiques des sous-types IIA, IIB et IIC (IPM : formes de poids moléculaires intermédiaires)

Le type II qui regroupe les malades, appelés variants de vWD, caractérisés par des anomalies qualitatives du vWF est lui-même subdivisé en sous-types (de A à H); les caractéristiques des sous-types IIA, IIB et IIC, les mieux définis, sont décrites dans le tableau 3, page 30.

II - TRANSMISSION

Le gène du vWF étant situé sur un autosome, le chromosome 12, la maladie de Willebrand, contrairement aux hémophilies, affecte les hommes et les femmes. La transmission autosomale de la maladie peut être soit de type dominant (types I, IIA et IIB), soit de type récessif (types IIC et III).

III - LE FACTEUR WILLEBRAND

1 - Biosynthèse

Des techniques immunologiques combinées avec la microscopie électronique ont démontré la présence et la synthèse du vWF par les cellules endothéliales (65) et par les mégacaryocytes (99,123).

Le précurseur initial de 2813 acides aminés (pré-pro-vWF) est rapidement dimérisé, après la perte du peptide signal de 22 acides aminés, par création de ponts di-sulfure reliant les deux pro-polypeptides dans la région C-terminale pour former un dimère de masse 500-700 kDa (35). Les différentes étapes de la maturation du vWF commencent au niveau du réticulum

endoplasmique (début de la glycosylation et de la sulfatation de la molécule). Les dimères passent ensuite dans l'appareil de Golgi où la glycosylation se poursuit, en même temps que se produit le clivage d'un grand polypeptide de 741 acides aminés du côté N-terminal (31). Le propeptide libéré, retrouvé dans les granules des plaquettes (119), est sécrété comme protéine à part entière (84) et correspond au vW:AgII déjà décrit (96). Ses fonctions en tant que protéine plasmatique ou plaquettaire restent inconnues (92b). Après ce clivage, la sous-unité mature du vWF est constituée de 2050 acides aminés. Les dimères s'unissent ensuite par l'intermédiaire de ponts disulfure du côté N terminal pour former une population de multimères de tailles variables (35) que l'on retrouve dans le plasma (de $0,5 \cdot 10^6$ à $20 \cdot 10^6$ kDa) et dans les granules α des plaquettes (de $0,5 \cdot 10^6$ à plus de $20 \cdot 10^6$ kDa). Le vWF est également présent dans le sous-endothélium, au niveau des artères et des veines, mais sa distribution est variable d'un vaisseau à l'autre et se modifie au cours de l'âge (146).

2 - Rôle

Le vWF intervient dans le phénomène d'adhésion des plaquettes au sous-endothélium et participe à la constitution du thrombus plaquettaire sur les lieux où s'est constituée une lésion de l'endothélium vasculaire. De plus, le vWF sert de protéine porteuse au FVIII, ce qui implique sa participation dans la coagulation plasmatique.

De nombreuses études ont permis de définir différents domaines localisés sur la sous-unité du vWF mature (Fig. 8, p. 34) : 2 domaines de liaison au collagène (acides aminés n° 542-622, 948-998), 2 domaines de liaison à l'héparine (acides aminés n° 1-272, 449-728), 1 domaine d'interaction avec le facteur VIII (acides aminés n° 1-272), 1 domaine de liaison à la GPIb (acides aminés n° 449-728), 1 domaine de liaison à la GPIIb/IIIa incluant la séquence RGDS (acides aminés 1744 -1747 : Arg-Gly-Asp-Ser).

3 - Interaction avec le facteur VIII

Le FVIII et le vWF circulent dans le plasma sous forme d'un complexe non covalent calcium - dépendant appelé FVIII/vWF. L'interaction avec le vWF protège le FVIII de l'action de protéases plasmatique, stabilisant l'activité du FVIII (58,138). Ces propriétés expliquent l'existence d'un déficit en FVIII dans la maladie de Willebrand.

Le site principal du vWF permettant la fixation du facteur VIII se situe dans les 272 premiers acides aminés du vWF mature (33,34). Des études immunologiques ont montré que deux anticorps monoclonaux dirigés contre le vWF pouvaient inhiber la fixation du FVIII : Ac 418 (127) et Ac W5-6A (5b). L'épitope de l'anticorps 418 est situé sur un fragment correspondant aux acides aminés 1 à 106 (109) alors que l'épitope de l'anticorps W5-6A est une séquence correspondant aux acides aminés 78 à 96 (5b). Un second site d'interaction avec le facteur VIII serait situé du côté C terminal de la molécule, dans le domaine D4, mais sa localisation précise reste encore inconnue (70b).

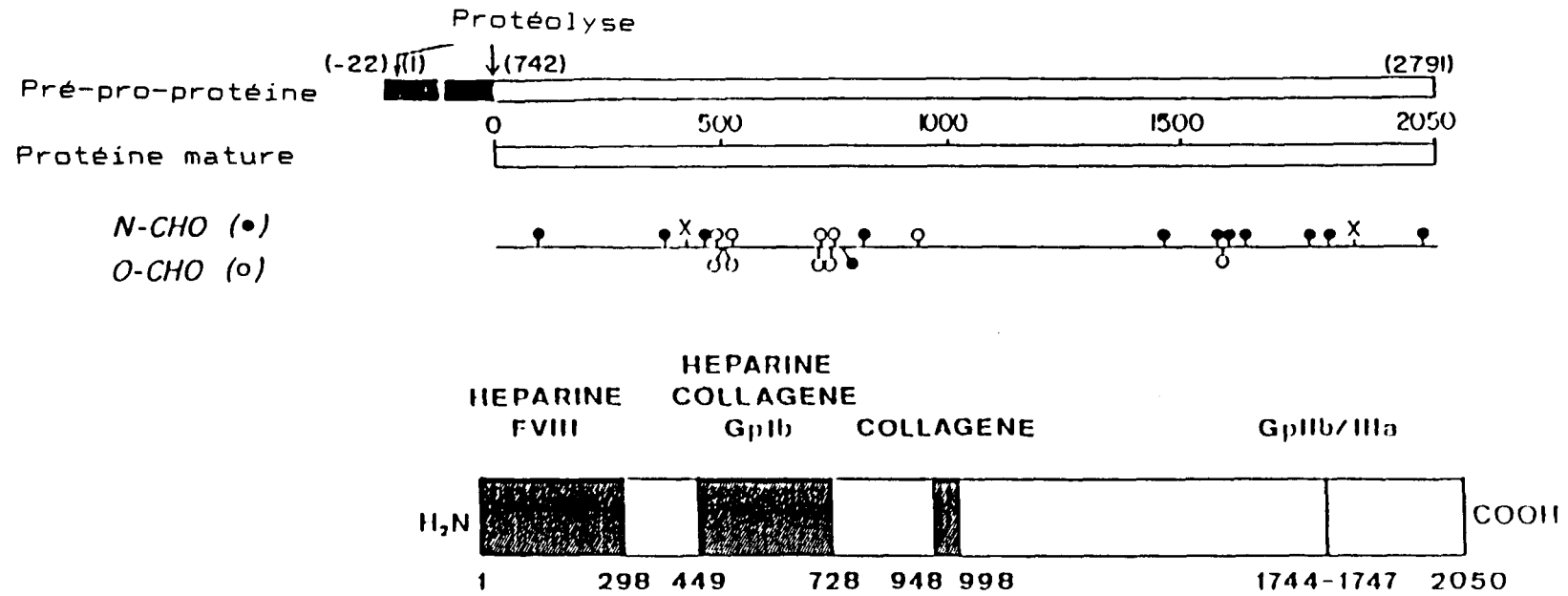


Fig. 8 : Schéma de la pré-pro-protéine, de la protéine mature et des différents domaines fonctionnels caractérisés sur le facteur Willebrand

N-CHO (●) : "N-glycannes"

O-CHO (○) : "O-glycannes"

X : site potentiel de N glycosylation non glycosylé

IV - DIAGNOSTIC GENOTYPIQUE

1 - Le gène du facteur Willebrand

Le gène du vWF (Fig. 9, p. 36), d'une longueur d'environ 178 kb, est localisé sur le bras court du chromosome 12, dans la région 12p12-12pter (44,135). Les séquences codantes sont réparties en 52 exons de taille très inégale (de 40 à 1379 pb : exon 28). La séquence de ces exons n'a été publiée que très récemment (85). Une région homologue à la région centrale du gène, correspondant aux exons 23 à 34 codant pour les acides aminés n° 990-1947, a été mise en évidence sur le chromosome 22 (104,85b,113b). Ce pseudogène diffère seulement d'environ 3 % de la séquence du gène du vWF.

Quatre domaines (A,B,C,D) répétés de 2 à 5 fois constituent plus de 90 % du gène du vWF (Fig. 9, p. 36). Les domaines A, constitués d'environ 220 acides aminés, présentent des homologies avec certaines régions du facteur B et du facteur C2a du complément, de l' α collagène type VI et des sous-unités α des récepteurs Mac-1, p150-95 et LFA-1. Les domaines C semblent homologues à certaines séquences de la thrombospondine et des α pro-collagène types I et III (85).

L'ARN messager du vWF comprend environ 8,8 kb et code pour une protéine de 2813 acides aminés (pré-pro-vWF). Le site d'initiation de transcription est situé 245 nucléotides en amont du codon correspondant à la Met initiale du pré-pro-vWF (4b,85). Le site d'addition du poly A est situé à 136 nucléotides en aval de la fin de la séquence codante.

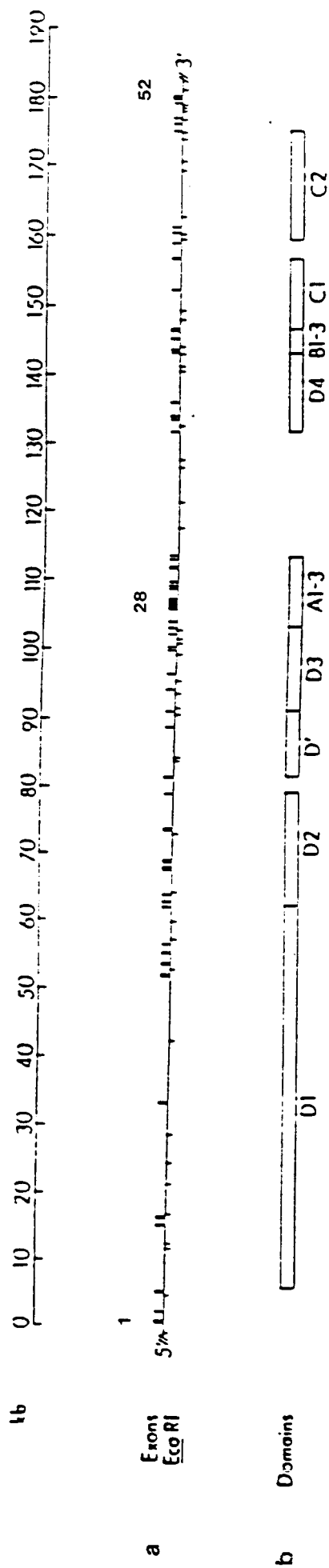


Fig 9 : schéma du gène du facteur Willebrand d'après Mancuso et al. (85).

- a : position des exons et carte de restriction par l'endonucléase Eco RI
- b : position des différents domaines caractérisés.

2 - Polymorphismes

L'analyse du gène du vWF dans le cadre d'études familiales et de diagnostic anténatal était limitée jusqu'en 1989 car les polymorphismes connus, tous bi-alléliques, étaient peu informatifs (les chiffres indiquent la fréquence de chaque allèle dans une population de type Caucasienne) :

1986	polymorphisme	Xba I	0,87/0,13	(112)
1986	polymorphisme	Bam HI	0,82/0,18	(100)
1987	polymorphisme	Xba I	0,08/0,92	(74)
1987	polymorphisme	Sac I	0,62/0,38	(72)
1987	polymorphisme	Rsa I	0,22/0,78	(59)
1987	polymorphismes	Taq I	0,51/0,49	(11)
			0,95/0,05	
1988	polymorphisme	Taq I	0,24/0,76	(75)
1989	polymorphismes	Taq I	0,75/0,25	(61)
			0,06/0,94	
1989	polymorphisme	Eco RI	0,86/0,014	(30)
1989	polymorphisme	Eco RI	0,07/0,93	(80)
1989	polymorphismes	Taq I	0,78/0,22	(87)
			0,14/0,86	

Depuis, plusieurs polymorphismes ont été décrits, notamment un polymorphisme multi-allélique de type VNTR dans l'intron 40 :

1990	polymorphismes	Stu I	0,30/0,70	(62)
			0,40/0,60	

1990	polymorphisme Rsa I	0,35/0,65	(73)
1990	polymorphisme Kpn I	0,56/0,44	(25)
1990	polymorphisme intron 40	VNTR	(107)
1990	polymorphisme intron 40	VNTR	(111)

De plus, de nouveaux polymorphismes ont été décrits dans l'article indiquant la séquence des exons (85).

3 - Anomalies du gène du vWF

La grande taille du gène du vWF (environ 178 kb) étant un obstacle à son séquençage chez les patients, peu de mutations ont, à ce jour, été identifiées (tableau 5 page 39). Par contre, plusieurs délétions ont été caractérisées chez des malades de type III ayant développé, suite au traitement substitutif, un inhibiteur du vWF (tableau ci-dessous).

DELETION	F VIII:Ag	vWF:Ag	ref
complete	< 3	< 1	101
> 110 kb	-	-	125
> 110 kb	-	-	125
2,3 kb	5	< 1	108

Tableau 4 : délétions caractérisées chez des malades de type III

- : non précisé

AA	mutation	type	ref
466	Val --> Gly	II B	a
468	Asn --> Thr	II B	a
543	Arg --> Try	II B	b
545	Arg --> Cys	II B	b
553	Val --> Met	II B	b
578	Arg --> Gly	II B	b
834	C --> T Arg --> Trp	II A	43
844	T --> A Val --> Asp	II A	43

Tableau 5 : mutations ponctuelles identifiées sur le gène du facteur Willebrand
La numérotation des AA correspond à celle de la protéine mature

a : Ces mutations ont été annoncées au XII^{ème} congrès de la Société Internationale de Thrombose et Hémostase, à Tokyo, en 1989, dans des résumés, par Vink et al. "The molecular defect in von Willebrand disease type Iib patient". VINK T, DE GROOT PG, FEDERICI AB, MANNUCCI PM, SIXMA JJ.

b : Ces mutations ont été annoncées au XIII^{ème} congrès de la société Américaine d'hématologie à Boston, en décembre 1990, mais n'ont pas, à ce jour été publiées :

"The molecular defect in type IIB von Willebrand disease (vWD) : identification of two potential missense mutations within the putative GPIb binding domain". COONEY KA, NICHOLS WC, BRUCK ME, BOWIE EJW, SHAPIRO A, GRALNICK HR, GINSBURG D.

"Evidence for a point mutation in the GPIb binding domain of von Willebrand's disease (vWD)". MURRAY EW, GILES AR, LILLICRAP D.

De plus, Lyons et al. ont annoncé dans un résumé, au congrès de la Société Américaine d'Hématologie en 1989, la caractérisation de 5 mutations faux-sens chez des variants de type II A. Ces mutations n'ont pas, à ce jour été publiées.

"Molecular basis of type IIA von Willebrand disease (vWD). LYONS S, BRUCK ME, BOWIE EJW, MONTGOMERY RR, GILL JC, YANG AY, GINSBURG D.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

A - EXTRACTION D'ADN ET D'ARN :

I - EXTRACTION MANUELLE D'ADN :

Dans cette méthode, après lavage et lyse des cellules, les protéines sont précipitées en présence de NaCl, puis l'ADN est précipité en présence de NaCl et d'éthanol (94). Cette technique d'extraction a été décrite pour de petits échantillons de sang (94). Nous l'avons adaptée pour l'extraction à partir de 5ml de sang.

II - EXTRACTION AUTOMATISEE :

L'extraction manuelle d'ADN nécessitant de nombreuses manipulations des échantillons, elle présente deux inconvénients importants :

- le risque d'inversion des échantillons lors de leurs manipulations

- le risque de contamination de l'échantillon par un autre ADN

Dans un cadre diagnostique, ces risques doivent être particulièrement évités. Pour ce faire, un système d'extraction automatisée a été mis en place dans le laboratoire. L'automate utilisé est le "NUCLEIC ACID EXTRACTOR, model 340 A" (Applied Biosystems), qui permet l'extraction d'ADN, sans manipulation préalable, à partir

de différents échantillons tels que sang total, cellules, villosités choriales... Cet appareil permet aussi l'extraction d'ARN à partir des différents échantillons cités ci-dessus.

1 - extraction d'ADN

L'extraction est réalisée sur un échantillon de 5ml de sang selon le protocole préconisé par Applied Biosystems.

2 - extraction d'ARN

Un échantillon de 100 ml de sang est prélevé sur anticoagulant ACD. A partir de 95 ml d'échantillon on sépare, par centrifugation, un "Plasma Riche en Plaquettes". Après une 2ème centrifugation, le culot de plaquettes est remis en suspension dans les 5 ml de sang conservés. L'extraction est alors réalisée selon le protocole préconisé par le fabricant de l'extracteur. Cette technique nous permet d'enrichir l'échantillon en ARN plaquettaire, donc, particulièrement en ARN du vWF.

B - " POLYMERASE CHAIN REACTION " (P.C.R.) OU AMPLIFICATION ENZYMATIQUE :

I - GENERALITES :

Le principe de cette technique, décrite en 1985 (114), est d'augmenter la quantité d'une séquence spécifique d'acides nucléiques que l'on veut analyser.

L'amplification enzymatique ou " Polymerase Chain Reaction " (P.C.R.), consiste en une répllication

spécifique d'une courte séquence d'ADN, initiée par deux oligonucléotides de synthèse : les amorces ou "primers". La réaction est cyclique, chaque cycle permettant de répliquer la séquence cible et donc de doubler en théorie la quantité d'ADN amplifié (Fig. 10, p. 44).

Un cycle est composé de 3 étapes, réalisées à différentes températures :

- dénaturation de l'ADN matrice
- hybridation des amorces
- synthèse enzymatique

Après n cycles on obtient un facteur d'amplification de $2^n - (n-1)$, ainsi pour 30 cycles on obtient un facteur théorique de 10^9 environ.

L'utilisation d'une ADN polymérase thermostable, le plus souvent isolée à partir d'une archéobactérie thermorésistante : *Thermus aquaticus* (19,115), a permis d' " automatiser " cette réaction, puisqu'il n'est plus nécessaire d'ajouter de l'enzyme après chaque étape de dénaturation.

II - LIMITES DE LA P.C.R. :

La P.C.R. est une méthode efficace, spécifique et sensible. Néanmoins elle présente certains inconvénients :

* il est nécessaire de connaître la séquence de la région que l'on veut étudier afin de choisir des amorces spécifiques.

* sa grande sensibilité (une seule molécule d'ADN suffit pour obtenir une amplification) est également l'une de ses principales limites : en

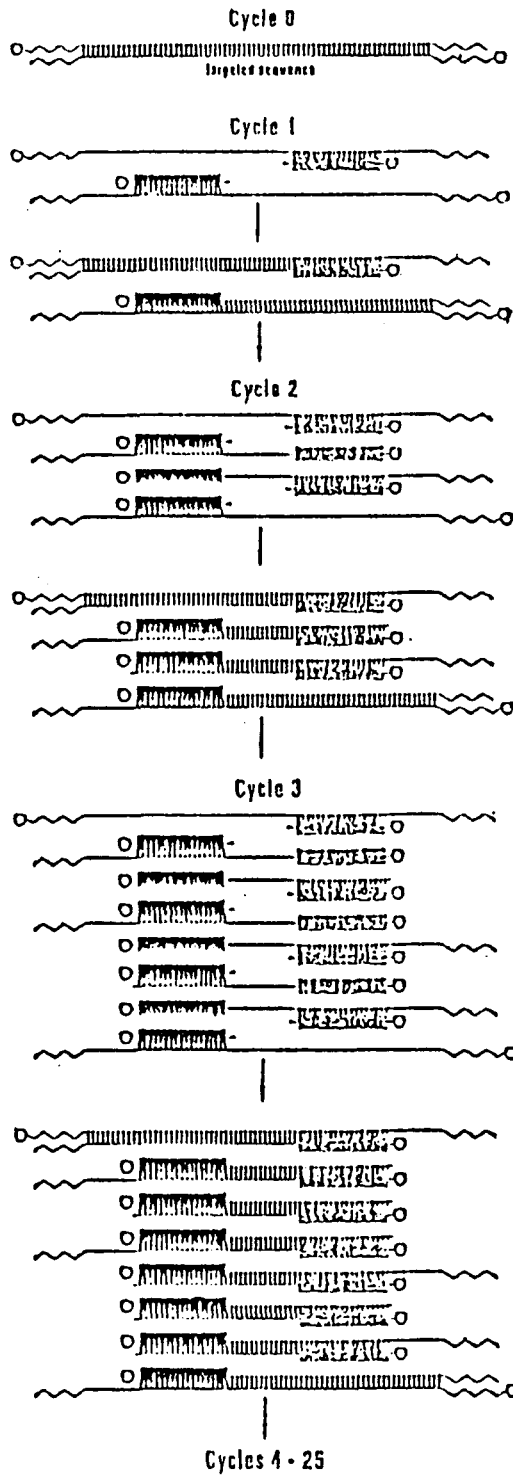


Figure 10 : PRINCIPE DE L'AMPLIFICATION ENZYMATIQUE

effet, la plus petite contamination par un ADN étranger entrainera une réaction faussement positive. Pour réduire au maximum ce risque il est nécessaire de prendre différentes précautions :

1 - dans le cadre des études réalisées au C.R.T.S., chaque étape de la P.C.R. (extraction d'ADN, préparation du mélange réactionnel, amplification, analyse des produits d'amplification) se fait dans des salles séparées. Chaque pièce, en surpression et ventilée en permanence par de l'air stérile, possède son propre circuit de ventilation.

2 - les tubes contenant le mélange réactionnel sont exposés pendant 5 min aux U.V. afin de détruire un éventuel ADN contaminant (118).

3 - toutes les pipettes utilisées sont à "déplacement positif".

4 - tous les réactifs sont aliquotés.

III - OPTIMISATION :

De nombreux facteurs peuvent influencer le résultat de la réaction de P.C.R.. Parmi ceux-ci certains ont particulièrement retenu notre attention :

- le choix des "amorces"
- la qualité des "amorces"
- la température de dénaturation

1 - choix des "amorces" :

La spécificité des amorces étant directement responsable de la qualité de l'amplification, leur choix

doit se faire selon des règles bien précises. Nous avons appliqué les règles suivantes :

- * respecter une taille minimale : 20 mers

- * essayer d'avoir un pourcentage de GC supérieur à 50%. Si l'amorce s'hybride sur une région riche en AT, augmenter sa taille.

- * éviter, si possible, les répétitions d'une même base (maximum 4) qui sont une cause de mésappariement.

- * éviter dans tous les cas les séquences poly G à cause des difficultés de synthèse de l'amorce.

- * éviter, si possible, les sites de restrictions, les palindromes pouvant être la cause de mésappariements.

- * faire un "test d'hybridation" de chaque amorce sur elle-même et de l'amorce 1 sur l'amorce 2.

Les règles définies sont les mêmes pour ces deux tests d'hybridation :

- * hybridation sur l'une des extrémités 3' : un maximum de 5 liaisons hydrogènes est accepté (rappel : liaison AT = 2 liaisons hydrogène, liaison GC = 3 liaisons hydrogène).

- * hybridation à l'intérieur de l'amorce : un maximum de 5 nucléotides appariés sera accepté, sauf dans le cas de la présence d'un site de restriction.

Un programme informatique développé au C.R.T.S. de Lille par Olivier FEUGEAS permet de visualiser toutes les hybridations possibles (Fig. 11, p. 47).

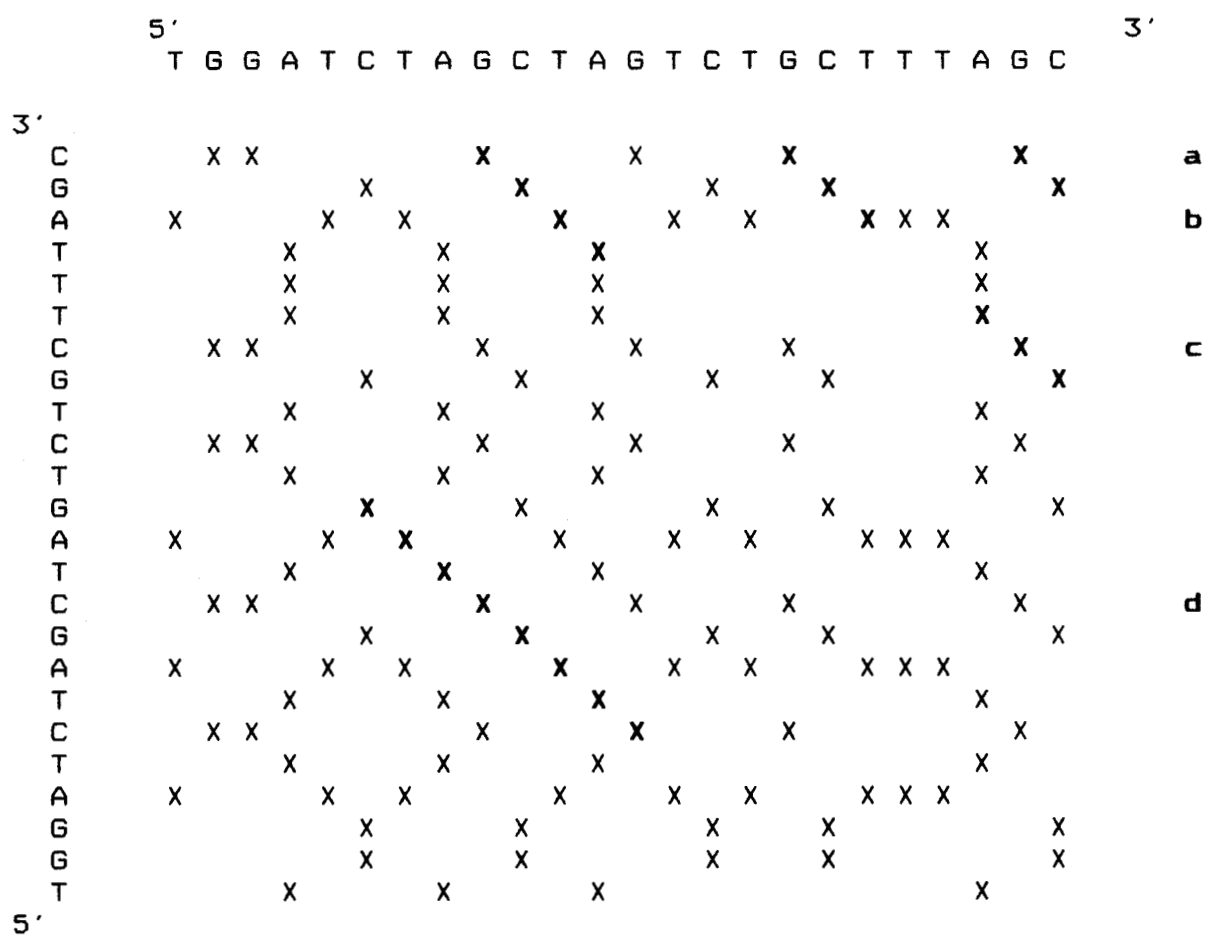


Fig 11 : exemple de test d'"hybridation" d'une amorce sur elle même

cette amorce est refusée pour 4 raisons :

- a : hybridation de 2 nucléotides (6 liaisons hydrogène) aux deux extrémités 3' de l'amorce
- b : hybridation de 4 nucléotides (10 liaisons hydrogène) à l'extrémité 3' de l'amorce
- c : hybridation de 6 nucléotides séparés par 2 "mis-match" à l'extrémité 3' de l'amorce
- d : hybridation de 8 nucléotides à l'intérieur de l'amorce

2 - qualité des "amorces" :

La qualité des amorces est très importante, particulièrement lorsque les amorces utilisées dans la P.C.R. sont utilisées pour le séquençage du fragment amplifié. L'analyse des amorces sur gel d'acrylamide à 20 % permet de vérifier, après coloration au bromure d'éthidium, que l'on ne visualise que l'amorce de taille spécifique, sans oligonucléotides de tailles intermédiaires.

Les amorces utilisés ont, pour la majorité d'entre eux, été synthétisées sur un " PCR MATE ", modèle 391 (Applied Biosystems). La séquence des amorces utilisées est indiquée en annexe à la fin de ce mémoire.

3 - température de dénaturation

Une des étapes les plus importantes de la P.C.R. est la dénaturation de l'ADN. Lors des premiers cycles la température doit être au moins de 94 ° C dans le milieu réactionnel. Une température inférieure ne permettrait pas une dénaturation complète de l'ADN génomique, en particulier des séquences riches en GC.

IV - CONDITIONS DE P.C.R. :

10 µl de tampon 10 X (100 mM Tris-HCl pH : 8,0;
500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 1 mg/ml gélatine)
10 µl de dNTP 2 mM (Pharmacia)
50 pM de amorce 1
50 pM de amorce 2
H₂O qsp 100 µl

0,3 à 0,5 µg ADN

dénaturation initiale : 5 min à 94°C

addition de 1 à 2 unité de Taq polymérase

(Amersham)

30 cycles : 1 min. à 94 ° C, 1 min. à 55 ° C,

2 min. à 72 ° C

Une aliquote (10 µl) est analysée par électrophorèse en gel d'agarose à 2 % ou en gel d'acrylamide à 8 % ou 12 % selon la taille des fragments à analyser.

V - CONDITIONS SPECIALES DE P.C.R. :

L'amplification de certains fragments a nécessité la mise au point de modification de la température d'hybridation des amorces. Dans le premier cas, polymorphisme Bcl I du FVIII, les conditions standard de P.C.R. ne permettent pas l'amplification du fragment spécifique, probablement à cause d'une absence d'hybridation des amorces. Par contre dans le deuxième cas, polymorphisme de l'intron 40 du vWF, nous avons observé, dans les conditions standard de P.C.R., la présence de fragments amplifiés non spécifiques probablement dûs à une hybridation non spécifique des amorces. Les conditions optimisées sont les suivantes :

Pour l'étude du polymorphisme Bcl I du FVIII :

* hybridation à 50 °C au lieu de 55 °C

* 40 cycles d'amplification au lieu de 30

Pour l'étude du polymorphisme de l'intron 40 du vWF :

* hybridation à 60 °C au lieu de 55 °C

* synthèse pendant 1 min au lieu de 2 min

Pour l'amplification simple brin, l'ADN est amplifié dans un premier temps selon les conditions décrites précédemment puis, après purification du fragment amplifié, une deuxième P.C.R. est réalisée en présence d'un seul primer afin de synthétiser du simple brin.

VI - P.C.R. A PARTIR D'ARN :

Après extraction de l'ARN , une première étape de transcription inverse permet d'obtenir un ADN complémentaire (ADNc) simple brin. Un aliquot de cet ADNc est ajouté dans les tubes d'amplification afin de servir de matrice lors du premier cycle de P.C.R..

* transcription inverse :

1 à 5 µg ARN

2 µl tampon 10 X de transcription inverse (Boehringer)

7 µl eau traitée au DEPC

50 U RNasin (Promega)

1 µl transcriptase inverse MMLV (200 unités)

incubation pendant 1 h à 37 °C

* amplification :

Une aliquote du mélange de transcription inverse est utilisée comme ADN matrice dans le milieu de P.C.R.. Les étapes suivantes de la P.C.R. ne sont pas modifiées.

C - ANALYSE DES FRAGMENTS AMPLIFIES :

I - ETUDE PAR DIGESTION PAR DES ENZYMES DE RESTRICTION :

Les enzymes de restriction sont des endonucléases bactériennes clivant spécifiquement les deux brins du DNA au niveau d'une séquence, en général palindromique, parfaitement définie (de 4 à 8 nucléotides). Les digestions sont réalisées par addition d'une endonucléase de restriction soit directement dans le milieu d'amplification, soit après précipitation des fragments amplifiés.

II - ETUDE PAR SEQUENCAGE :

Nous avons utilisé le kit "Sequenase" version 2 (USB) (98,116).

Le séquençage peut être réalisé à partir d'ADN soit double brin, soit simple brin. Les protocoles utilisés pour la purification de ces deux types de matrices sont différents :

* ADN double brin : après amplification, les fragments peuvent être purifiés soit sur Centricon 30 soit sur gel d'agarose (puis transfert par électrophorèse sur une membrane de DEAE cellulose). La réaction de séquençage est réalisée sur environ la moitié du produit d'une amplification.

* ADN simple brin : après amplification l'ADN est purifié sur Centricon 100. La réaction de séquençage

est réalisée sur un quart du produit d'amplification environ.

Le protocole de séquençage est légèrement différent selon le type d'ADN matrice utilisé. En effet, l'ADN double brin est dénaturé par un choc thermique (10 min à 100 °C puis transfert dans la carboglace), alors que l'ADN simple brin est dénaturé par chauffage à 65 °C.

RESULTATS

RESULTATS

A - AMPLIFICATION A PARTIR DE SANG , SANS EXTRACTION DE L'ADN

I - METHODE

Le principal risque d'erreur de la P.C.R. étant la contamination, le nombre de manipulations de l'échantillon avant l'amplification doit être réduit au minimum . La méthode que nous avons mise au point et qui est décrite page 56 permet d'éliminer les risques liés à la purification de l'ADN. Plusieurs types d'échantillons peuvent être amplifiés directement par cette méthode : sang total, cellules ...

II - DISCUSSION

Plusieurs équipes ont optimisé des micro-méthodes d'extraction d'ADN, nécessitant un petit volume d'échantillon, dont le principe est de recueillir l'ADN après une lyse des cellules, suivie ou non d'une extraction. Ces méthodes permettent de diminuer, mais pas d'éliminer, les manipulations de l'échantillon avant amplification.

Nous avons montré qu'un échantillon brut de sang (ou de cellules, cheveux...) peut être introduit directement dans le milieu réactionnel de P.C.R., la seule modification permettant l'amplification de l'ADN consistant à réaliser une alternance de températures (94° pendant 3 minutes et 55° pendant 3 minutes) lors de l'étape de dénaturation initiale. Cette alternance de températures doit être répétée au moins trois fois. Ces chocs thermiques réalisés lors de la première étape de dénaturation, avant addition de la Taq polymérase, permettent de lyser les cellules et probablement de détacher les protéines liées à l'ADN génomique. Une longue dénaturation initiale, de l'ordre de 15 min, donne de moins bons résultats que la méthode décrite ci-dessus. Les chocs thermiques successifs sont donc nécessaires ; peut-être permettent-ils une meilleure dénaturation des protéines du milieu (hémoglobine...) ou des protéines liées à l'ADN.

L'intérêt de cette méthode que nous avons appliquée à l'étude de différentes séquences génomiques réside non seulement dans le fait qu'elle élimine toutes les manipulations de l'échantillon inhérentes à l'extraction d'ADN, sources potentielles de contaminations et donc d'erreurs, mais aussi qu'elle permet d'obtenir un résultat plus rapide car l'étape d'extraction d'ADN nécessite environ une journée.

Cette méthode est utilisée en routine pour les études familiales réalisées par P.C.R. dans le

laboratoire. Certains résultats obtenus par la technique de Southern après extraction de l'ADN sont ainsi confirmés par PCR à partir de sang total.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans Nucleic Acids Research, insérée page 56.

Direct PCR from whole blood, without DNA extraction

B.Mercier, C.Gaucher, O.Feugeas and C.Mazurier

Centre Régional de Transfusion Sanguine 19-21, rue Camille Guérin, BP 2018, 59012 Lille Cédex, France

Submitted August 23, 1990

Typically DNA used in PCR assays is usually extracted according to the phenol-chloroform method (1) or by an alternative 'salting-out' rapid purification (2). Moreover partially purified DNA obtained with rapid procedures have been reported to be suitable for PCR amplification (3).

We describe here a more simple and efficient method to amplify DNA directly from whole blood samples without any purification. This method proved to work not only on fresh blood samples but also on frozen blood samples stored several months at -20°C . According to our procedure, a small volume of blood (1 or 2 μl) is introduced directly in the PCR reaction (100 μl PCR reaction: 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml gelatin, 200 μM each dNTP) and the amplification is performed as on purified DNA with only a modification of the initial denaturation step. Instead of heating the samples for 5 min at 94°C as usual on genomic DNA template, the whole blood PCR reactions were heated for 3 min at 94°C then cooled for 3 min at 55°C and this two-step incubation was repeated 3 times. In fact, the efficiency of the whole blood PCR relies on this alternating heating-cooling steps since a single longer heating incubation resulted in very poor amplification. In our experiments we successfully amplified fragments up to 900 bp from frozen whole blood samples. Aliquots of amplified fragments from PCR, performed either on purified DNA or blood, were analysed directly on agarose gels by ethidium bromide staining: no difference was noticed between purified DNA and blood samples for all the different amplified sequences tested (Figure 1). These data suggest that using whole blood is as sensitive and specific as using purified DNA as starting material for PCR assays, providing the initial denaturing step modification. However, because of the potential Taq polymerase inhibitors (such as hemoglobin) it contains, whole blood used in too large amount may turn to be detrimental to the PCR reaction, as shown on Figure 2 where as little as 4 μl of blood totally inhibited the amplification reaction. We therefore recommend the use of 1 or 2 μl of whole blood in a 100 μl PCR reaction in order to prevent such inhibitory effects. This rapid and convenient procedure provides an alternative to tedious DNA purifications and is especially of interest in family studies since it prevents possible errors inherent to the DNA extraction procedure such as samples inversion or contamination. However, this method may not be sensitive enough for some PCR studies like viral DNA detection or chimerism detection after grafts involving the amplification of 'marginal' sequences.

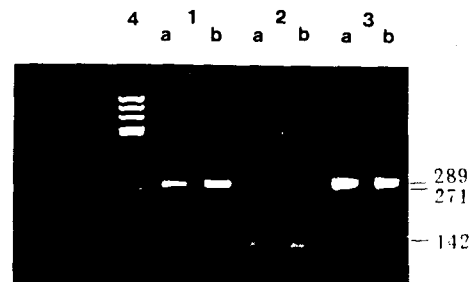


Figure 1. PCR amplified fragments electrophoresed on a 2% agarose gel. Lane 4: pBR322 Hae III digest. Lanes 1a and b: amplification of HLA DR B alleles (271 bp) 35 cycles of 1 min at 94°C , 1 min at 62°C and 2 min at 72°C .

Lanes 2a and b: amplification of intron 17 BcII polymorphic site of the FVIII gene (142 bp) 40 cycles of 1 min at 94°C , 1 min at 50°C , 2 min at 72°C . Lanes 3a and b: amplification of exon 18 of the von Willebrand factor gene (289 bp) 35 cycles of 1 min at 94°C , 1 min at 55°C , 2 min at 72°C . Superscript a: 1 μl of whole blood in 100 μl of PCR reaction with special denaturation: 3 min at 94°C , 3 min at 55°C , repeated 3 times. Superscript b: 0.3 μg of purified DNA in 100 μl of PCR reaction denaturation: 5 min at 94°C . 2.5 U of Taq polymerase (Amersham) were added in 100 μl of PCR reaction after the initial denaturation step.

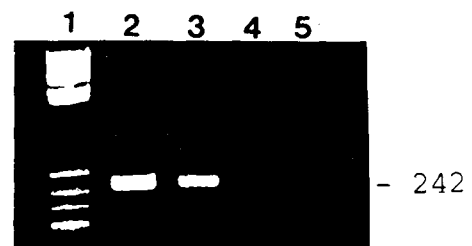


Figure 2. Blood sample volume as a factor of the PCR reaction efficiency. All PCR are performed on HLA DQ A (242 bp). Lane 1: pBR322 Hae III digest. Lanes 2 to 5: respectively 1, 2, 3 and 4 μl of whole blood. Special denaturation (3 min at 94°C , 3 min at 55°C , repeated 3 times) before the addition of 2.5 U of Taq polymerase (Amersham) and 40 cycles of amplification (1 min at 94°C , 1 min at 60°C , 2 min at 72°C) were performed.

REFERENCES

1. Gross Bellard *et al.* (1973) *Eur. J. Biochem.* **36**, 32-38.
2. Miller *et al.* (1988) *Nucl. Acids Res.* **16**, 1215.
3. Ferre *et al.* (1989) *Nucl. Acids Res.* **17**, 2141.

B - ETUDE DES HEMOPHILIES :

I - ETUDES FAMILIALES

1 - Hémophilie A (gène du facteur VIII) :

a - Généralités

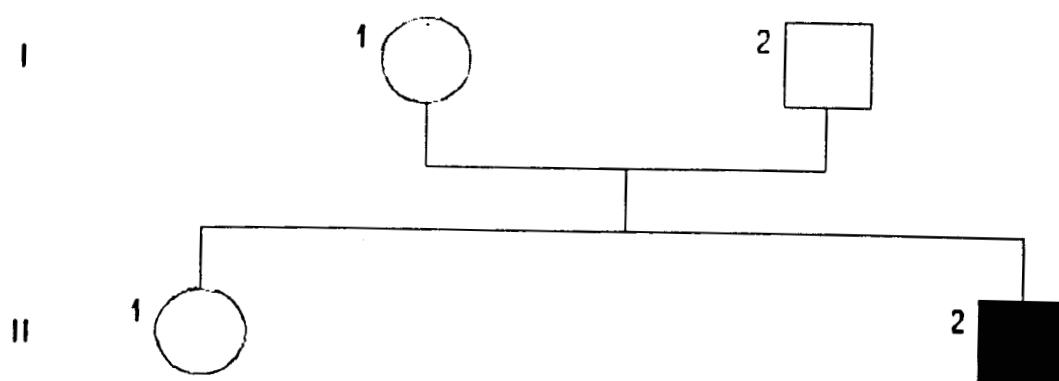
Parmi les 7 polymorphismes décrits (voir page 20), trois sont utilisés pour les études familiales réalisées dans le laboratoire : Bcl I intragénique, Bcl I extragénique et Xba I extragénique. Seul le polymorphisme Bcl I intragénique est étudié par P.C.R. dans le laboratoire (voir ci-dessous). En effet, bien que l'étude par P.C.R. des polymorphismes Xba I et Hind III ait été décrite (71,126), nos résultats ont montré la présence d'un fragment amplifié non spécifique, de taille identique à celle de l'un des fragments de digestion. Ce phénomène, non décrit dans les articles originaux (71,126), rend impossible la distinction entre un sujet homozygote dont le fragment n'est pas digéré et un individu hétérozygote.

b - Polymorphisme Bcl I :

Ce polymorphisme situé dans l'intron 18 (46) est généralement étudié par Southern Blot. L'étude par P.C.R., décrite en 1987 (71), permet d'obtenir un résultat plus rapide. Le fragment amplifié ne contient qu'un seul site de restriction Bcl I, présent (allèle +) ou non (allèle -). Un exemple d'étude familiale est représenté dans la figure 12 (page 59).

Nous avons modifié l'une des amorces décrites (71), P1, en y introduisant un site de restriction Bcl I et en ajoutant une vingtaine de nucléotides en 5' du primer (voir article page 60). Les conditions de P.C.R. ne sont pas modifiées. La figure 12 montre l'étude comparative d'une famille faite à l'aide des amorces P1 ou P1-b. L'intérêt de cette amorce modifiée est qu'elle permet de mettre en évidence une éventuelle digestion partielle, telle que celle constatée pour l'individu n° II-2 dans notre exemple.

Ces résultats font l'objet d'une publication en cours dans Thrombosis Research, insérée page 60 à 62.



arbre généalogique de la famille

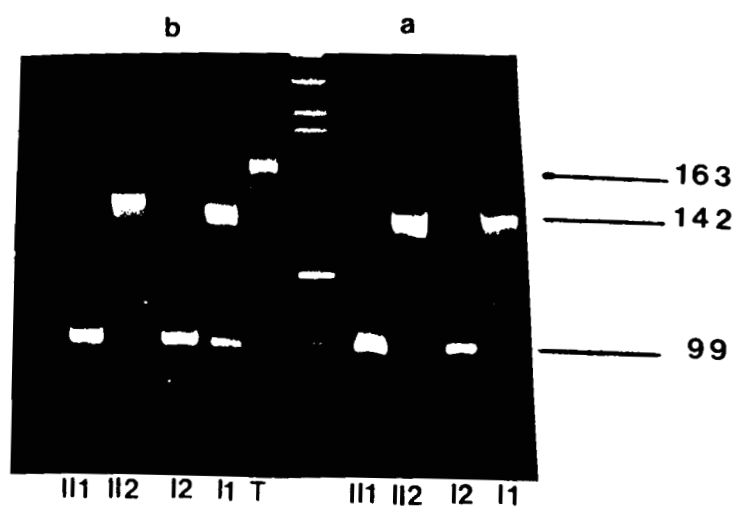


Fig. 12 : Analyse du polymorphisme Bcl I du facteur VIII
(électrophorèse en gel d'acrylamide à 8 %)

a : étude réalisée avec les amorces décrites par Gitshier
(P1 et P2)

b : étude réalisée avec l'amorce modifiée P1-b et l'amorce
P2

II1, II2, I1, I2 : amplifiats digérés par Bcl I

T : contrôle d'amplification non digéré

IMPROVEMENT IN THE ANALYSIS OF THE Bcl I POLYMORPHISM OF THE
FACTOR VIII GENE BY PCR : INTRODUCTION OF A CONSTANT Bcl I SITE
IN ONE OF THE PRIMERS AS A DIGESTION CONTROL

Mercier B., Gaucher C., Mazurier C.

Laboratoire de Recherche sur l'Hémostase
Centre Régional de Transfusion Sanguine
(Director : Dr J.J. Huart)
21, rue Camille Guerin - 59012 - LILLE - Cedex - FRANCE

INTRODUCTION

Haemophilia A is an X-linked recessive bleeding disorder resulting from a deficiency of functional coagulation factor VIII and affecting 1/5000 newborn males. The analysis of the Bcl I polymorphism of the factor VIII gene intron 18, using either Southern blot (1) or PCR (2), has been previously reported. One of the limits of this analysis using PCR is the absence in the amplified fragment of a constant Bcl I restriction site providing an internal control of digestion. The present report describes a simple method to introduce a constant Bcl I site in the amplified product using a modified PCR primers set.

MATERIALS AND METHODS

The two PCR primers used, P1-b (see below) and P2 (5' - TTCGAATTCTGAAATTATCTTGTTTC - 3'), were synthesized on a PCR Mate model 391 (Applied Biosystems). 100 to 500 ng of genomic DNA were first denatured for 5 min at 94 °C in a 100 µl reaction mixture containing 10 mM Tris pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 % gelatin, 200 µM dNTPs and 50 pmoles of each primer. After cooling at 55 °C, 1 unit of Taq polymerase (Amersham) was added and the samples were subjected to 40 cycles of PCR (3) (1 min at 94 °C, 1 min at 50 °C, 2 min at 72 °C). Amplification from whole blood, without DNA extraction, can also be performed (4). After amplification a 19 µl aliquot of the PCR reaction mixture was

KEYWORDS : Factor VIII, PCR, family studies

directly digested by addition of 5 units of Bcl I restriction endonuclease (Appligene) for 3 h at 50 °C, electrophoresed on a 8 % acrylamide gel and visualized by ethidium bromide staining.

RESULTS

In order to introduce a constant Bcl I restriction site to the amplified product, a new PCR primer, P1-b, was designed modifying the previously described primer P1 (2) :

P1 = 5' - TAAAAGCTTTAAATGGTCTAGGC - 3'
 P1 - b = 5' GAGTTATAAAGGATGCTCTGACAAGCTTTAAATGGTCTAGGC - 3'

The change at the P1 5' end (TCA instead of TAA) and the addition of a 21 nucleotide sequence (5'-GAGTTATAAAGGATGCTCTGA-3') created the Bcl I restriction site TGATCA (underlined). The 21 nucleotide sequence added was chosen not complementary to the genomic DNA region concerned and served only to significantly modify the PCR product size after Bcl I digestion.

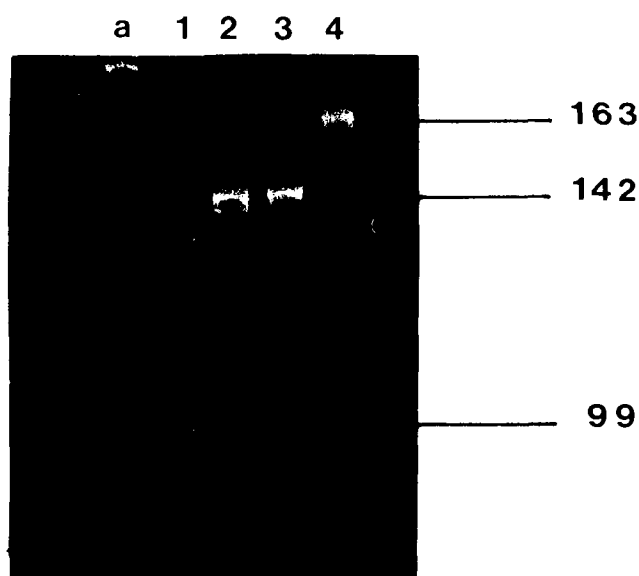


Fig 1 : electrophoresis of the Bcl I restriction digests.
 a : pBR 322 Hae III digest
 1 : homozygous + ; 2 : homozygous -
 3 : heterozygous +/- ; 4 : undigested amplified fragment

Fig. 1 shows the different Bcl I digestion patterns observed using the modified primers set. The amplified 163 bp fragment was digested in either 2 fragments of 142 and 21 bp (allele -) or 3 fragments of 99, 43 and 21 bp (allele +). The two smallest 21 and 43 bp fragments could not be visualized in the electrophoretic conditions used (8 % acrylamide gel). The absence of the 163 bp fragment (shown in lane 4) in these samples rules out an incomplete digestion.

DISCUSSION

The main pitfall in the interpretation of any RFLP pattern is the occurrence of partial digestion, an homozygote for the digested allele (+) possibly being mistaken for an heterozygote. In the case of RFLP analysis after PCR this misinterpretation may occur when the amplified fragments do not contain constant polymorphic restriction sites providing convenient internal control of digestion. Possible digestion control consists in the digestion of a plasmid containing the same restriction site. Nevertheless, because of their different size the co-digested plasmid and the PCR product often cannot be analyzed using the same electrophoretic conditions. Constant restriction sites localized on another PCR co-amplified fragment may also be used. However, as the two sequences are co-amplified, the digested fragments must be different in length in order to be distinguished, which limits the choice of candidate control PCR products available. Furthermore, the synthesis of another set of primers is required to amplify the control fragment. Nevertheless, such a digestion control has already been reported for the study of the Bcl I polymorphism (5).

In this report we describe an easier way to introduce an internal control of digestion in a PCR product by modifying one of the PCR primers. It is worth noting that although only 50 % of the modified primer length hybridized to the genomic DNA, the PCR conditions, especially the annealing temperature, did not need to be changed to achieve an efficient amplification. This method modifying one of the PCR primers in using the 21 nucleotide sequence described in this report (except the 3 nucleotide 3' end), has also been used successfully in our laboratory to create other "control" restriction sites (Hinf I, Kpn I, Fok I, Sac II, Hae III and Sau3A I) in HLA DR B1 and HLA DQ B1 PCR amplified sequences (6).

REFERENCES

1. GITSCHIER J., DRAYNA D., TUDDENHAM E.G.D., WHITE R.L., LAWN R.M. Genetic mapping and diagnosis of hemophilia A achieved through a Bcl I polymorphism in the factor VIII gene. *Nature*, 314, p738-740, 1985.
2. KOGAN S.C., DOHERTY M., GITSCHIER J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences : Application to hemophilia A. *New England Journal of Medicine*, 317, p985-990, 1987.
3. SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., EHRLICH H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, p487-491, 1988.
4. MERCIER B, GAUCHER C, FEUGEAS O, MAZURIER C. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucleic Acids Research*, 18, p5908, 1990.
5. SAMPIETRO M., YANG X.Y., SACCHI E., MANNUCCI P.M. Restriction of polymerase chain reaction products for carrier detection and prenatal diagnosis of hemophilia A : description of an internal control. *Thrombosis and Haemostasis*, 63, p527-528, 1990.
6. URYU N, MAEDA M, OTA M, TSUJI K, INOKO H. A simple and rapid method for HLA-DR B and DQ B typing by digestion of PCR amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens*, 34, p20-31, 1990.

2 - Hémophilie B (gène du facteur IX) :

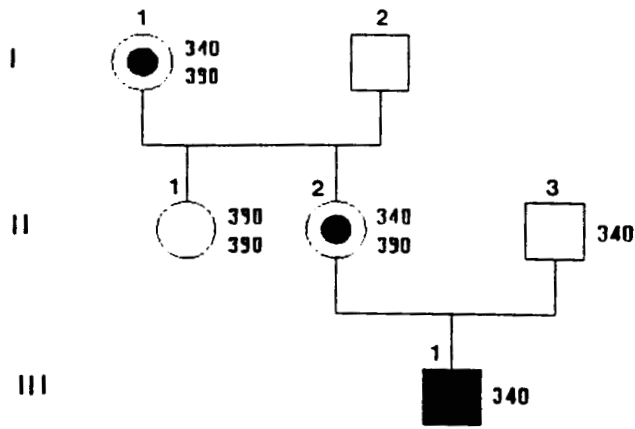
Parmi les polymorphismes décrits à ce jour sur le gène du FIX (voir page 27) (12b, 14, 26, 36, 39, 41, 51, 97, 136, 140), trois sont étudiés par P.C.R. : le polymorphisme Taq I (informatif dans 40 % des études) le polymorphisme Dde I et le polymorphisme Hha I. En effet, la proportion des femmes hétérozygotes, pour au moins l'un de ces 3 polymorphismes, est estimée à 89 %.

a - Polymorphisme Dde I :

Ce polymorphisme, décrit en 1984 (140), résulte de la présence ou de l'absence d'une petite séquence de 50 nucléotides, située dans l'intron 1 (NT 5505 à 5554). Etudiés par Southern Blot, la distinction des deux allèles est difficile car ils ne diffèrent que de 50 nucléotides (fragments de restriction de 1750 et 1700 pb).

Afin d'étudier ce polymorphisme par P.C.R. nous avons choisi deux amorces encadrant ce polymorphisme et générant par amplification deux fragments plus petits: 389 pb (NT 5315 à 5704) et 339 pb, en présence ou absence de l'insert. Ces fragments sont facilement séparés sur gel d'agarose à 2 % (Fig. 13, p. 64).

Un article publié en 1990 (52b) décrit l'analyse de ce polymorphisme par P.C.R. selon un principe identique à celui que nous avons employé.



arbre généalogique de la famille

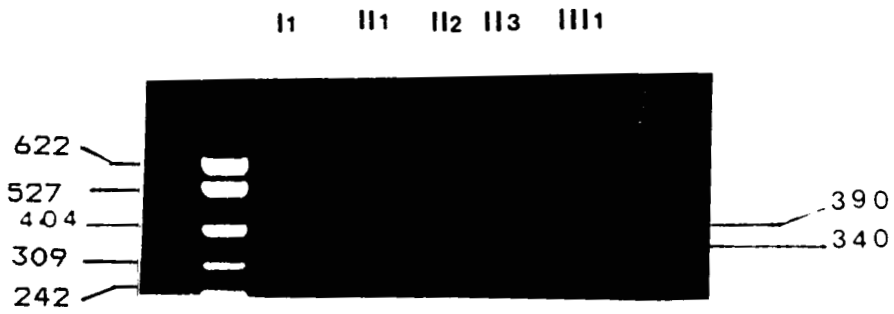
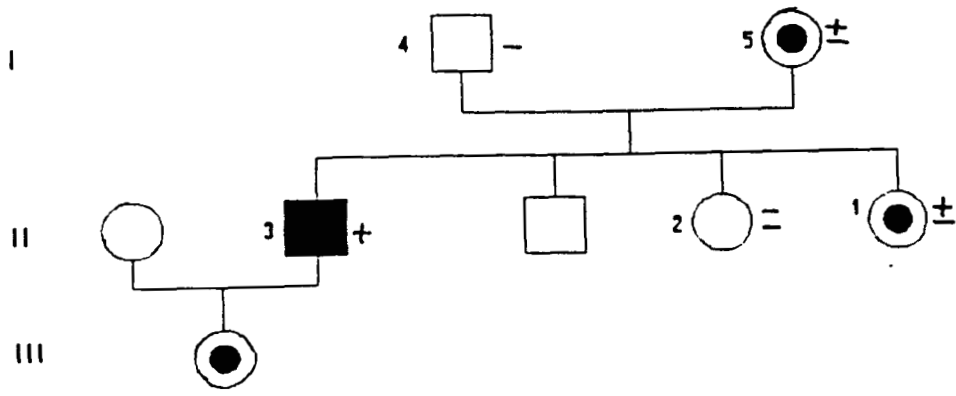


Fig 13 : analyse du polymorphisme "Dde I"
(électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %)

b - Polymorphisme Taq I :

Ce polymorphisme, décrit en 1984 (39), est situé dans l'intron 4. Il était jusqu'à présent étudié par Southern Blot, les deux allèles observés faisant respectivement 1,9 et 1,3 kb. Afin de l'étudier par P.C.R. nous avons choisi deux primers amplifiant un fragment de 997 bp qui contient la fin de l'intron 3, l'exon 4 et le début de l'intron 4 (NT 10310 à 11307). Ce fragment amplifié contient le site Taq I polymorphe et en présence de ce site ce fragment est digéré en deux fragments de 802 et 195 pb (voir article page 67 et étude familiale page 66). La taille importante de ce fragment amplifié ne permet pas d'utiliser la technique décrite pour le polymorphisme Bcl I pour introduire un site de restriction Taq I constant dans ce fragment car il ne serait pas possible de différencier, dans des conditions d'électrophorèse utilisable en routine, des fragments de 997 et 1017 pb si l'on modifiait l'une des amorces.

Ces résultats font l'objet d'une publication en cours dans Thrombosis Research, insérée page 67 à 68.



arbre généalogique de la famille F

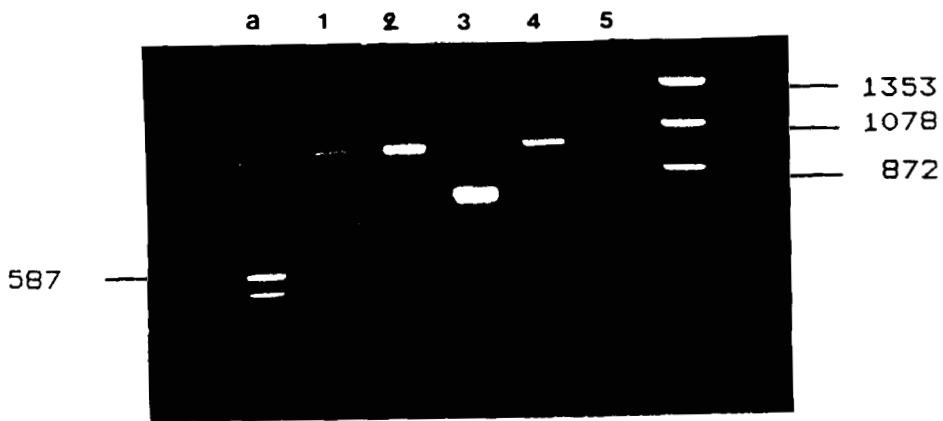


Fig. 14 : Etude du polymorphisme Taq I
 (électrophorèse en gel d'agarose à 2 %)
 a : pBR 322/Hae III
 b : λ /Hind III + ϕ X174/Hae III
 + : présence de l'allèle digéré (802 pb)
 - : présence de l'allèle non digéré (997 pb)

DETECTION OF THE TAQ I POLYMORPHISM OF THE FACTOR IX GENE BY P.C.R.

67

Mercier B., Gaucher C., Mazurier C.

Laboratoire de Recherche sur l'Hémostase
Centre Régional de Transfusion Sanguine
(Director : D^r J.J. Huart)

21 rue Camille Guérin - 59012 - LILLE Cédex - FRANCE

INTRODUCTION

Haemophilia B is an X-linked recessive bleeding disorder resulting from a deficiency of functional coagulation factor IX and affecting 1/30,000 newborn males. Several RFLPs have been identified on the factor IX gene : Taq I (1), Xmn I (2), Dde I (3) BamH I (4), Msp I (5). Using these RFLPs approximatively 76 % of females at risk for carrying haemophilia B should be heterozygous. The analysis of the Taq I polymorphism alone gives about 40 % informativity in carrier detection. This polymorphism has been localized in the 5' region of factor IX gene intron 4 and is commonly analyzed by Southern blot hybridization. The present report describes the Taq I RFLP analysis using the PCR amplification method.

MATERIALS AND METHODS

In order to amplify this region by P.C.R. we designed two specific primers (P1 = CATCCCAATGAGTATCTACAGGGGAGGA ; P2 = AGTGAATTCCTCATTAGCACTGTGTGCGTTTCT). The 997 bp amplified fragment thus includes the 3' end of intron 3, exon 4 and the 5' end of intron 4 (NT 10310 to NT 11307). 100 to 500 ng of genomic DNA were first denaturated for 5 min at 94°C in a 100 µl reaction mixture containing 10 mM Tris pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 % gelatin, 200 µM dNTPs and 50 pmoles of each primer. After cooling at 55°C, 1 unit of Taq polymerase (Amersham, England) was added and the samples were subjected to 30 cycles of P.C.R. (1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 2 min at 72°C). After amplification, an aliquot (19 µl) of the P.C.R. reaction was directly digested by addition of 5 units of Taq I restriction endonuclease for 1 hour at 65°C, electrophoresed on a 2 % agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

RESULTS

Fig 1 shows the different patterns observed on heterozygous (lane 1) and homozygous subjects (lanes 2 and 3). The Taq I allele + is associated with the 802 bp restriction fragment while the allele - corresponds to the undigested amplified product of 997 bp.

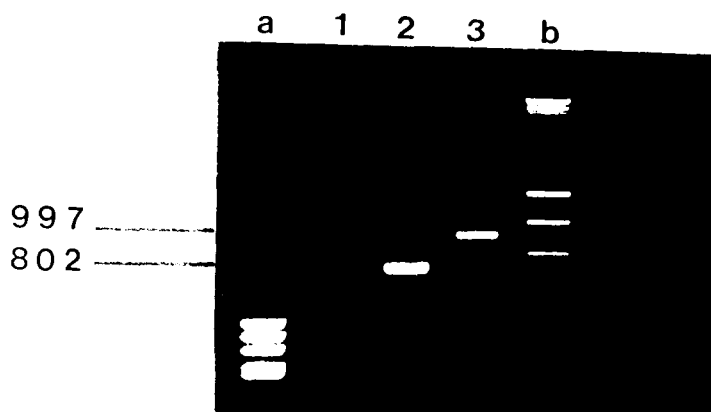


Fig 1 : electrophoresis of the Taq I restriction digests
 a : pBR 322 Hae III digest
 b : λ Hind III digest + ϕ X 174 Hae III digest
 1 : heterozygous +/- . 2 : homozygous + . 3 : homozygous - .

DISCUSSION

When compared to the Southern Blot method hybridization method this P.C.R. analysis is easier, more rapid and less expensive. Furthermore this amplification could be performed on whole blood without any DNA purification (6); in this case, the result can be obtained in less than 5 hours after receiving the samples. As the amplified fragment includes all the exon 4 encoding the first EGF-like domain of factor IX, this method may also be used to detect a possible abnormality of this region.

REFERENCES

1. CAMERINO, G., GRZESCHIK, K.H., JAYE, M., DE LA SALLE, H., TOLSTOSHEV, P., LECOCQ, J.P., HEILIG, R., MANDEL, J.L. Regional localization on the human X chromosome and polymorphism of the coagulation factor IX gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 498-502, 1984.
2. GIANELLI, F., CHOO, K.H., WINSHIP, P.R., RIZZA, C.R., ANSON, D.S., RESS, D.J.G., FERRARI, N., BROWNLEE, G.G. Characterization and use of an intragenic polymorphism marker for detection of carriers of haemophilia B. *Lancet*, i, 239-241, 1984.
3. WINSHIP, R.R., ANSON, D.S., RIZZA, C.R., BROWNLEE, G.G. Carrier detection in haemophilia B using two further intragenic restriction fragment length polymorphisms. *Nucl. Acid Res.*, 12, 8861-8872, 1984.
4. HAY, C.W., ROBERTSON, K.A., YONG, S.L., THOMPSON, A.R., GROWE, G.H., MAC GILLIVRAY, R.T.A. Use of a Bam HI polymorphism in the factor IX gene for the determination of haemophilia B carrier status. *Blood*, 67, 1508-1511, 1986.
5. CAMERINO, G., OBERLE, I., DRAYNA, D., MANDEL, J.L. A new MspI restriction fragment length polymorphism in the haemophilia B locus. *Hum Genet*, 71, 79-81, 1985.
6. MERCIER B., GAUCHER C., FEUGEAS O., MAZURIER C. Direct P.C.R. from whole blood, without DNA extraction. *Nucl. Acid Res.* 18, 5908, 1990.

c - Polymorphisme Hha I :

Ce polymorphisme, dont l'étude par P.C.R. a été décrite en 1989 (41), est situé à 8 kb en 3' du gène du facteur IX. Il est détecté par digestion des fragments amplifiés par l'endonucléase de restriction Hha I, puis électrophorèse sur gel d'acrylamide à 8 %. Ce polymorphisme, non détectable par Southern blot (voir page 68), est analysé en routine par P.C.R. dans le laboratoire.

3 - Discussion

a - Intérêts de la P.C.R. :

Les études familiales permettant le diagnostic génotypique des femmes conductrices et le diagnostic anténatal de l'hémophilie, étaient réalisées jusqu'en 1986 uniquement par Southern blot. Les résultats sont obtenus par cette méthode dans un délai de 8 à 10 jours minimum. L'utilisation de la P.C.R., décrite fin 1985 (114), permet, dans certains cas, de donner un diagnostic en 48 à 72 h.

La quantité d'échantillon nécessaire à l'analyse par P.C.R. est beaucoup plus faible (0,5 µg d'ADN) que celle nécessaire pour réaliser un Southern blot (environ 10 µg). Cet avantage peut, dans certains cas, être très important, notamment dans le cadre d'un diagnostic anténatal où le prélèvement d'une grande quantité de villosités choriales est rarement possible.

La P.C.R. permet aussi l'étude de nouveaux polymorphismes qui ne peuvent pas être détectés par Southern blot. En effet, dans les cellules l'ADN est méthylé et certaines endonucléases de restriction, sensibles à l'état de méthylation de l'ADN, ne reconnaissent plus alors leur site de restriction. Ainsi la séquence GCGC, méthylée au niveau du CpG, ne sera pas reconnue par l'endonucléase de restriction Hha I. Par contre, après amplification par P.C.R., cette séquence n'est pas méthylée, le site de restriction est reconnu et permet donc de détecter un nouveau polymorphisme sur le gène du facteur IX. Ainsi la P.C.R. permettra peut-être de révéler de nouveaux polymorphismes non détectables par Southern blot au niveau des sites de restriction d'endonucléases sensibles à la méthylation (exemples : Mae II, Hpa I, Hph I).

Autre avantage de la P.C.R., l'amplification à partir d'échantillon brut, permet de vérifier les résultats obtenus par Southern blot. La comparaison des résultats obtenus par 2 techniques différentes, l'une à partir d'échantillon brut, l'autre à partir d'ADN extrait, permet de contrôler la fiabilité des résultats.

Enfin, l'étude des polymorphismes par P.C.R. ne nécessite pas l'utilisation d'isotopes radioactifs, contrairement aux techniques classiques d'hybridation de "Southern blot".

b - Limites de la P.C.R. :

Sur chacun des gènes du FVIII et du FIX, nous avons tenté d'étudier 3 polymorphismes par P.C.R.. Les résultats obtenus pour 4 de ces polymorphismes (F VIII : Bcl I ; F IX : Dde I, Taq I, Hha I) sont satisfaisants. Néanmoins l'absence, dans le fragment amplifié, d'un site de restriction servant de témoin de digestion interne ne nous permet pas de distinguer un fragment correspondant à un allèle non digéré d'un fragment correspondant à un allèle mal digéré (polymorphismes Bcl I, Taq I, Hha I), ceci pouvant entraîner une interprétation erronée du résultat.

C'est pourquoi nous avons modifié une des amorces correspondant au polymorphisme Bcl I, en y introduisant un site de restriction Bcl I et en ajoutant une vingtaine de nucléotides en 5' de l'amorce. La modification de cet oligonucléotide n'a pas rendu nécessaire un changement des conditions d'hybridation lors de l'amplification bien que le pourcentage d'homologie ait diminué : 100 % pour le 20 mers (amorce P1) et 48 % pour le 42 mers (amorce P1-b). L'explication réside certainement dans le fait que les nucléotides supplémentaires ont été ajoutés en 5' de l'amorce, les 20 nucléotides spécifiques de la séquence à amplifier pouvant donc s'hybrider sur leur séquence complémentaire en laissant la partie 5' de l'oligonucléotide "flotter". Grâce au contrôle de digestion interne ainsi apporté, l'interprétation est maintenant fiable. Des essais concernant le choix de nouvelles amorces, selon le même

principe, pour d'autres polymorphismes (Taq I, Hha I) sont en cours. Le modèle que nous avons choisi correspond à un véritable témoin de digestion interne puisque la modification est réalisée durant la synthèse de l'amorce.

Certaines équipes ont, elles, opté pour un témoin constitué par un site de restriction localisé sur un plasmide. La distinction par électrophorèse des fragments correspondant au polymorphisme étudié et au contrôle de digestion n'est possible que si la taille de ces fragments est différente, ce qui limite le choix des "contrôles" de digestion possibles.

Les deux autres polymorphismes (Xba I et Hind III, tous deux situés sur le gène du FVIII) ne sont pas, actuellement, étudiés par P.C.R. dans le laboratoire car les résultats obtenus ne sont pas interprétables, à cause de la présence de fragments non spécifiques. Il est nécessaire de choisir et d'essayer de nouvelles amorces afin d'obtenir une meilleure spécificité d'amplification.

c - Stratégie utilisée dans le laboratoire:

Les trois polymorphismes utilisés dans le laboratoire pour les études familiales des hémophilies B sont analysés par P.C.R. (polymorphismes Dde I, Hha I et Taq I). Dans le cadre de ces études familiales, il n'est donc plus nécessaire de réaliser de Southern blot.

Par contre, sur les trois polymorphismes utilisés pour les études familiales des hémophilies A seul le polymorphisme Bcl I intragénique est étudié par

P.C.R.. En effet, le polymorphisme Bcl I extragénique, multiallélique, ne peut pas être étudié par P.C.R. car la séquence de cette région n'est pas publiée. Les études familiales sont donc encore réalisées par Southern blot afin d'analyser d'une part le polymorphisme Xba I (non interprétable par P.C.R.) et d'autre part, simultanément, les deux polymorphisme Bcl I, intragénique et extragénique. Le résultat du polymorphismes Bcl I intragénique est contrôlé par P.C.R.. La P.C.R., bien qu'étant une technique très prometteuse, ne permet donc pas actuellement d'abandonner complètement le "Southern blot" qui reste indispensable pour certaines études.

d - Conclusion :

La généralisation de la P.C.R. appliquée aux études des RFLPs doit donc être menée avec précaution. Il est nécessaire de réaliser des contrôles permettant de vérifier toutes les étapes conduisant au diagnostic. En l'absence de l'un de ces contrôles, le résultat ne peut pas être considéré comme rigoureusement fiable : les risques d'erreurs liés à la grande sensibilité de la technique de P.C.R. elle même ou ceux liés aux réactions enzymatiques (Taq polymérase, endonucléase de restriction) sont, dans ce cas, trop importants.

II - RECHERCHE D'ANOMALIES DES GENES DU FVIII ET DU
FIX

1 - Hémophilie A :

Le gène du FVIII des patients hémophiles A est étudié systématiquement dans le laboratoire après digestion par l'endonuclease de restriction Taq I, par "Southern Blot" et hybridation avec le cDNA du FVIII. Cette étude permet de mettre en évidence la présence de fragments de restriction de différentes tailles, correspondant à un ou plusieurs des exons du FVIII, et de détecter ainsi d'éventuelles anomalies : délétion, insertion, mutation affectant un site de restriction.

Chez l'un des patients (patient V.P.) cette étude a montré une anomalie au niveau du fragment de restriction comprenant l'exon 24.

* données phénotypiques :

F VIII:C < 1 %

F VIII:Ag < 1 %

présence d'inhibiteur

* résultats :

Par P.C.R. nous avons montré que l'exon 22 est présent mais que, par contre, les exons 23, 24, 25 et 26 sont délétés chez ce patient (absence d'amplification). Les limites exactes de cette délétion ne sont pas encore définies. Une approche par Southern blot avec hybridation à l'aide de sondes spécifiques de la région 3' non codante du gène du FVIII devrait

permettre de déterminer si cette délétion s'étend au delà de l'exon 26 et d'en préciser l'étendue.

2 - Hémophilie B :

Dans le but de détecter d'éventuelles délétions, nous avons amplifié systématiquement tous les exons du gène du FIX de 20 hémophiles B.

Cette étude nous a permis de déceler une anomalie chez deux patients (patients A.O. et P.M.). Parmi les autres hémophiles testés, aucune anomalie n'a pu être détectée par cette approche.

a - étude du patient A.O. :

* données phénotypiques :

F IX:C = 9 %

F IX:Ag = 66 %

* résultats :

Nous avons montré par P.C.R. que les exons 1, 2, 3, 5, 6, 7 et 8 sont présents au niveau du gène de ce patient. Par contre l'absence d'amplification de l'exon 4 chez ce malade suggèrait que l'exon 4 était partiellement ou totalement délété.

Afin de tester cette hypothèse l'ADN du patient a été digéré par des endonucléases de restriction possédant des sites de restriction situés soit à proximité de l'exon 4, soit dans celui-ci (Taq I, Fok I, Xba I, Fig. 15) puis analysé par Southern Blot, à l'aide d'une sonde partielle de l'ADN complémentaire de cette région, utilisée pour la détection du polymorphisme Taq I.

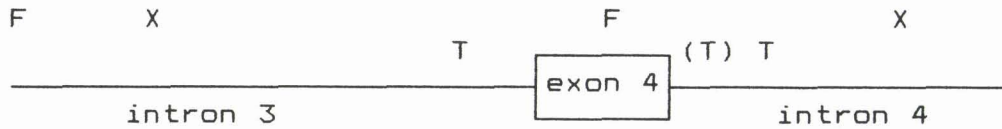


Fig. 15 : carte de restriction partielle de la région contenant l'exon 4 du gène du facteur IX
 T : site de restriction Taq I, (T) : site polymorphe
 F : site de restriction Fok I
 X : site de restriction Xba I

Aucune différence n'a été détectée par cette méthode entre le profil de restriction du patient et celui des témoins. Ce résultat indiquant que l'anomalie ne résultait pas d'une délétion importante, d'autres hypothèses sont envisageables :

- petite délétion incluant la région d'hybridation de l'une des amorces.
- mutation ponctuelle empêchant l'hybridation de l'une des amorces.
- inversion d'une séquence englobant la région de fixation de l'une des amorces.



Fig. 16 : carte de restriction partielle de la région contenant l'exon 4 du gène du facteur IX
 * : sites de restriction Taq I, constants
 (*) : site de restriction Taq I polymorphe
 P1-P2 : fragment de 997 pb
 P3-P4 : fragment de 1963 pb

L'impossibilité d'amplifier, à l'aide d'un autre couple d'amorces (P3 et P4) dont la position est indiquée ci-dessus (Fig. 16), un fragment de plus grande

taille chez le patient A.O. permet d'écarter les deux premières hypothèses. L'anomalie ne serait donc ni une petite délétion, ni une mutation ponctuelle affectant la région d'hybridation de l'un des deux amorces (P1 ou P2), mais pourrait résulter :

- d'une inversion d'un fragment d'ADN contenant la région d'hybridation de l'une des amorces pour chacun des 2 couples utilisés.

- de la délétion d'une séquence d'ADN incluant obligatoirement la région de fixation de 2 des amorces (P1 et P3 ou P2 et P4) et pouvant contenir une partie ou la totalité de l'exon 4, accompagnée de l'insertion d'une autre séquence de taille similaire.

Pour caractériser cette anomalie nous envisageons deux approches :

- hybridation de Southern blot à l'aide de différentes sondes partielles de l'ADN complémentaire.

- amplification directe à partir d'ARN messager qui devrait nous permettre de déterminer si les exons 3 et 5 sont contigus ou s'il existe une partie de la séquence de l'exon 4 sur l'ARN.

- amplification d'un grand fragment d'ADN (plusieurs kb) et son séquençage qui devrait permettre de caractériser l'anomalie.

b - étude du patient P.J. :

Le patient, hémophile B majeur, présente un retard mental (à 38 ans, QI = 36). Ce patient a

développé, suite aux transfusions nécessitées par de nombreux épisodes d'anémies, des anticorps anti-érythrocytes : ces anticorps reconnaissent un antigène public. De plus, ce patient a développé, après traitement substitutif, un inhibiteur.

* données phénotypiques :

F IX:C < 1 %

F IX :Ag < 2 %

* résultats :

Aucun des exons du gène du FIX n'est détecté chez ce patient après P.C.R. : le gène du FIX est complètement délété. Ce résultat concorde avec l'étude antérieure par Southern blot réalisée par C. De La Salle (laboratoire du Pr Cazenave, C.R.T.S. de Strasbourg). Une étude chromosomique réalisée dans le laboratoire du Pr J.L. Mandel à Strasbourg (INSERM U 184) a démontré que la délétion s'étend du locus DXS 102 au locus DXS 369, ce qui correspond à environ 10 cM (10 % de recombinaison méiotique) soit approximativement 10 000 Kb car 1 cM correspond à environ 1 000 kb, cette valeur variant selon la partie du génome analysée.

3 - Amplification à partir d'ARN

Après purification d'ARN total à partir de 5 ml de sang total prélevé sur EDTA suivie d'une étape de transcription inverse, l'amplification est réalisée selon le protocole standard. Deux amorces situés dans deux exons différents ont permis l'amplification d'un fragment spécifique de l'ARN du FVIII (de 250 pb), comprenant les

exons 22,23 et 24. Cette méthode nous a donc permis de mettre en évidence la présence de l'ARNm du facteur VIII dans le sang. Ces résultats préliminaires permettent d'envisager une étude systématique de l'ARN des hémophiles A par P.C.R. puis séquençage.

4 - Discussion

Les études réalisées sur les hémophiles A et B ont permis de localiser les anomalies responsables de la maladie chez 3 patients. La méthode utilisée (amplification systématique des exons et/ou digestion enzymatique) ne peut détecter que des anomalies importantes de type délétion, insertion, inversion et des mutations ponctuelles situées dans la région d'hybridation de l'un des primers ou sur un site de restriction. La recherche de toutes les mutations ponctuelles nécessiterait l'utilisation de méthodes telles que l'électrophorèse en gel de gradient dénaturant, ou le séquençage systématique de tous les exons chez chaque patient.

a - L'analyse de l'ADN du patient V.P., hémophile A, montre que l'anomalie responsable de la maladie est très vraisemblablement une délétion qui comprend les exons 23 à 26, codant pour le domaine C qui constitue la majorité de la chaîne légère du facteur VIII activé. La délétion qui comprend au moins 16 % du gène, soit 9 % de la protéine, entraîne une hémophilie

majeure. La détermination des limites exactes de cette délétion est en cours.

b - Les résultats obtenus lors de l'étude de l'ADN du patient A.O. et des deux autres patients de cette famille, hémophiles B, sont apparemment contradictoires. En effet l'étude par Southern blot montre que l'anomalie n'est ni une délétion importante, ni une insertion, ni une inversion puisque le profil de restriction observé est identique à celui d'ADN témoin. Par contre, l'amplification de l'exon 4 n'étant pas possible, l'anomalie affecte un fragment d'au moins 350 pb. Cet exon étant séparé des exons 3 et 5 par des introns de 3689 pb et 7163 pb respectivement, il est donc impossible d'amplifier le fragment d'ADN génomique comprenant les exons 3, 4 et 5. L'utilisation d'autres sondes ADN complémentaires partielles et l'amplification de l'ARNm devrait permettre de déterminer si les exons 3 et 5 sont contigus sur l'ARN ou si une partie de l'exon 4 est également présente. L'exon 4 code le premier domaine de type EGF ("epidermal growth factor") du FIX, qui contient un site de fixation du calcium, lequel serait essentiel pour maintenir une conformation permettant une bonne interaction entre le FIXa et le FVIIIa, le FX et les phospholipides. Plusieurs mutations ont été rapportées dans l'exon 4, l'une entraîne une hémophilie majeure (81) alors que les autres sont responsables, comme chez ce patient, d'hémophilie mineure (22,37,50).

c - Les résultats de P.C.R. confirment que le gène du facteur IX est complètement délété chez le patient P.J., hémophile B majeur. Les résultats sont identiques chez les deux autres patients de cette famille. L'étude réalisée dans le laboratoire du Pr Mandel (INSERM U 184 à Strasbourg) a montré que cette délétion, estimée à environ 10 cM, comprend non seulement le gène du FIX mais aussi les gènes CDR et mcf2. La protéine codée par le gène CDR est exprimée dans le cerveau et dans les cellules nerveuses (27). L'absence de ce gène est peut être la cause du retard mental observé chez le patient P.M.. Le gène mcf2 ne semble pas avoir un rôle très important dans les cellules ou au cours du développement, étant donné le phénotype du patient P.J.. En outre, l'apparition d'anticorps dirigés contre un antigène public situé sur les globules rouges chez deux malades de cette famille souvent transfusés indique que la région délétée pourrait contenir un gène impliqué dans la synthèse de cet antigène.

On estime en général que le génome humain, composé d'environ $3 \cdot 10^9$ pb, code pour 50 000 à 100 000 gènes, ce qui représente en moyenne un gène toutes les 30 à 60 000 pb. Chez le patient P.M. la délétion, qui fait environ 10 cM, soit 5 à $10 \cdot 10^6$ pb devrait donc comprendre 60 à 300 gènes. La délétion d'un si grand nombre de gènes devrait entraîner de nombreuses anomalies à défaut d'être létale. On peut donc supposer que le nombre de gènes situés dans la région délétée est inférieur au nombre théorique, suggérant que la répartition des gènes n'est pas

uniforme au sein du génome humain (communication personnelle de Mr Mandel).

d - la mise en évidence et la caractérisation par séquençage de mutations ponctuelles responsables de maladies génétiques est souvent difficile car le nombre d'exons à étudier est trop important (exemple : 26 exons pour le FVIII) pour une analyse systématique individuelle. L'amplification à partir de l'ARN devrait permettre de résoudre en partie ces problèmes en n'étudiant que la séquence codante. Nous avons montré qu'après extraction d'ARN total à partir d'un petit échantillon de sang (5ml) la P.C.R permet l'amplification spécifique de l'ARN du FVIII. Toutefois, notre technique ne nous permet pas, actuellement, d'amplifier des fragments d'ARN de taille supérieure à 400 pb.

C - ETUDE DE LA MALADIE DE WILLEBRAND

Les deux principaux axes de recherche auxquels nous avons contribué sont :

- les études familiales à l'aide de polymorphismes du gène du vWF afin d'analyser la transmission des différentes formes de vWD et d'envisager un diagnostic génotypique des individus porteurs d'une anomalie ainsi que le diagnostic anténatal des formes sévères.

- la caractérisation des anomalies responsables d'une forme particulière de vWD, appelée type "Normandy", afin de mieux connaître le mécanisme d'interaction entre le FVIII et le vWF.

I - POLYMORPHISME Msp I DE L'INTRON 19

1 - mise en évidence et caractérisation

C'est en étudiant le patient D.S. dont la mutation dans l'exon 19 (page 136) supprime l'un des deux sites reconnus par l'endonucléase de restriction Msp I que nous avons mis en évidence ce polymorphisme non décrit. Nos résultats montrent que le deuxième site, présent dans la séquence publiée par Mancuso (85), est absent sur certains chromosomes (Fig. 17, p. 84). Ce site est situé dans l'intron 19, à 23 pb en 3' de l'exon 19.

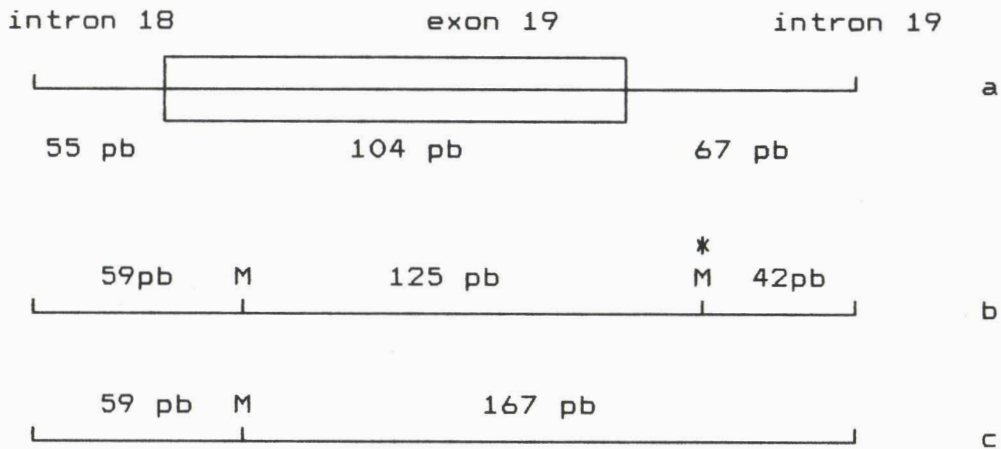


Fig. 17 : schéma de digestion du fragment amplifié
 a : fragment amplifié
 b : allèle +
 c : allèle -
 M : site de restriction Msp I
 * : site polymorphe

L'amplification de l'ADN de 50 personnes non apparentées et la digestion par l'endonucléase de restriction Msp I, a permis de déterminer la fréquence des deux allèles (voir article page 86).

2 - discussion

La séquence publiée (85) du gène du vWF présente l'allèle + du polymorphisme de l'intron 19 qui serait, en fait, le moins fréquent d'après les résultats de notre étude, effectuée sur une population de type Caucasienne. Ce résultat montre donc que, malgré le séquençage des exons et des régions non codantes adjacentes, certains polymorphismes du gène du vWF n'ont probablement pas encore été identifiés, bien qu'il y en ait déjà plus de 19 décrits (voir page 37). Lors de la mise en évidence d'une nouvelle

mutation il faut donc s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un polymorphisme non décrit, dont l'incidence peut être faible, avant de présumer que cette mutation est effectivement responsable de la maladie.

Le polymorphisme que nous avons mis en évidence est intéressant car il peut être étudié facilement et rapidement. La probabilité d'hétérozygotie pour ce polymorphisme est de 0,46, ce qui le rend utile dans les études familiales. Toutefois, son caractère bi-allélique contrairement au second polymorphisme rapporté ci-dessous, limite son informativité.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Nucleic Acids Research*, insérée page 86.

An *MspI* polymorphism in the von Willebrand Factor gene

B.Mercier*, C.Gaucher and C.Mazurier

Laboratoire de Recherche sur l'Hemostase, Centre
Regional de Transfusion Sanguine, 21 rue Camille Guerin,
59012 Lille cedex, France

Source/Description: Two primers (W17 and W18) were used to amplify a 226 bp long fragment including exon 19 and a part of introns 18 and 19 of the human von Willebrand Factor gene (VWF) (1).

Primers:

W17 = AGGGCTCTAGATCAGTCACTGTGGCCCT

W18 = TGGCCGCGAGCTCCCTCACTCCACC

Polymorphism: After PCR amplification (30 cycles: 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 2 min at 72°C), the amplified fragments were digested by *MspI* restriction endonuclease. Two *MspI* sites were present in the published sequence (1) but one of these sites, 23 bp in 3' of exon 19, was shown to be either present (allele +: 125 + 59 + 42 bp) or absent (allele -: 167 + 59 bp).

Frequency: Estimated in 50 unrelated Caucasians
allele +: 0.33 allele -: 0.67

Chromosomal Localization: 12p12-12pter (2).

Mendelian Inheritance: Co-dominant segregation shown in 2 families.

References: 1) Mancuso, D.J. *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 19514-19527. 2) Ginsburg, D. *et al.* (1985) *Science* 228, 1401-1426.

II - CARACTERISATION DU POLYMORPHISME DE L'INTRON 40

Lors du 12^{ème} congrès de la Société Internationale de Thrombose et Hémostase, à Tokyo en 1989, Peake et al. (106b) ont rapporté la présence d'un polymorphisme situé dans l'intron 40 du gène du vWF, pour lequel 5 allèles avaient été identifiés après amplification d'une partie de cet intron. Ce polymorphisme, de type VNTR ("Variable Number of Tandem Repeats") résultait, selon les auteurs, de la répétition du tétranucléotide ATCT. Ne disposant que de ces données et de la séquence publiée l'année suivante(85), nous avons choisi deux amorces permettant l'amplification de la totalité de la séquence variable de l'intron 40.

1 - étude de ce polymorphisme :

L'analyse de la séquence publiée a révélé la présence de plusieurs sites de restriction dont 2 pour l'endonucléase Alu I (Fig. 18, p. 88) et 1 pour l'endonucléase Rsa I. Après amplification par P.C.R., en présence de $\alpha^{35}\text{S}$ dATP, d'une partie de l'intron 40 (NT 1639 à 2404), le fragment amplifié est digéré par l'endonucléase de restriction Alu I puis analysé sur gel de séquençage afin de déterminer la taille exacte des différents fragments de restriction obtenus (voir article pages 95 et 96).

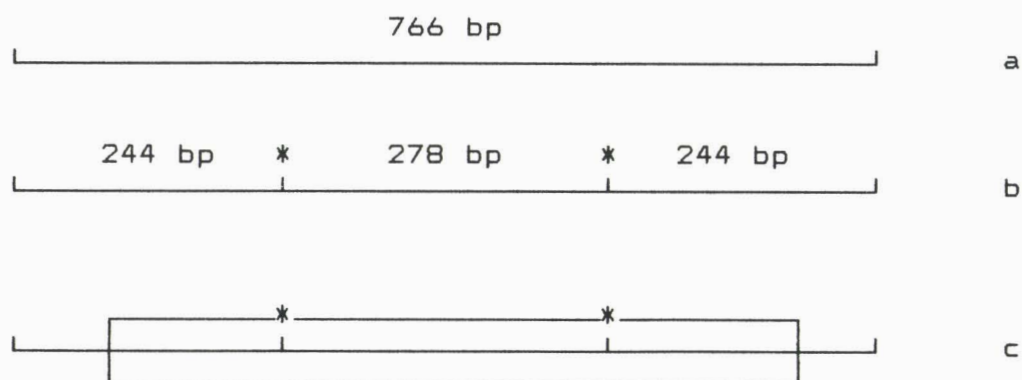


Fig. 18 :schéma du fragment amplifié selon la séquence publiée (85):

- a : fragment amplifié
- b : fragment digéré par Alu I
- * : site de restriction Alu I
- c : position de la séquence variable

2 - résultats :

Pour chaque individu étudié, 3 fragments de restriction par gène, soit 6 fragments au total, sont généralement différenciés après électrophorèse et autoradiographie. Pour certains échantillons cependant, l'on ne décèle que 4 ou 5 fragments, plusieurs d'entre eux étant de taille identique. Ceux-ci sont cependant facilement décelables car de "double intensité", aisément détectable à l'oeil nu (Fig. 19 p. 90) ou après enregistrement densitométrique de l'autoradiographie (Fig. 20 p. 91). Il est à noter que chaque fragment de digestion se présente en fait sous forme d'un "doublet" sur l'autoradiographie : une deuxième bande de plus faible intensité est visible à environ 1 à 2 bases sous le fragment spécifique (Fig. 19 p. 90). Lorsque la digestion

par l'endonucléase de restriction Alu I est réalisée pendant 12 h, au lieu de 1 h, une troisième bande apparaît, elle aussi de plus faible intensité, située à 1 ou 2 bases sous la seconde bande .

Chaque allèle est donc caractérisé par trois fragments de digestion. Ne pouvant pas connaître la taille exacte du fragment amplifié avant digestion (car il est difficile de déterminer, par électrophorèse, la taille de fragments d'environ 750 à 820 pb lorsqu'ils ne diffèrent que de 4 ou d'un multiple de 4 nucléotides), on ne peut pas savoir quels fragments digérés correspondent à chacun des deux allèles par l'étude d'une seule personne. Seule l'étude de plusieurs générations dans une famille permet donc d'associer à chaque allèle les fragments de digestion correspondants.

Afin de déterminer les différents allèles de 89 personnes non apparentées, nous avons étudié, pour chacune d'elles, plusieurs membres de leur famille, soit au total 235 personnes. Cette étude de 40 familles nous a permis de caractériser 87 allèles différents correspondant à 178 chromosomes (voir tableaux 6-a et 6-b, pages 92 et 93). De plus, certains allèles présentant un profil identique après digestion par l'endonucléase de restriction Alu I ont des profils différents après digestion par une autre endonucléase de restriction (exemple : Rsa I).

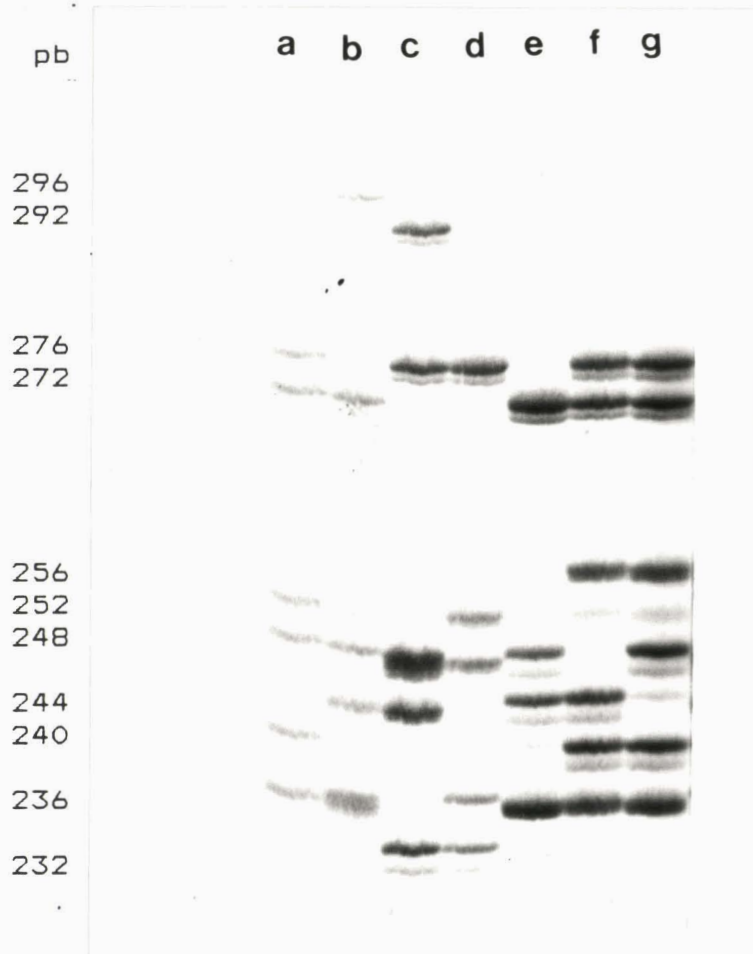


fig 19 : étude du polymorphisme de l'intron 40
(autoradiographie)

- a : 6 fragments de restriction
- b : la bande 236 pb est présente en double
- c : la bande 248 pb est présente en double
- d : la bande 276 pb est présente en double
- e : les bandes 272 + 236 pb sont présentes en double
- f : 6 fragments de restriction
- g : 6 fragments de restriction

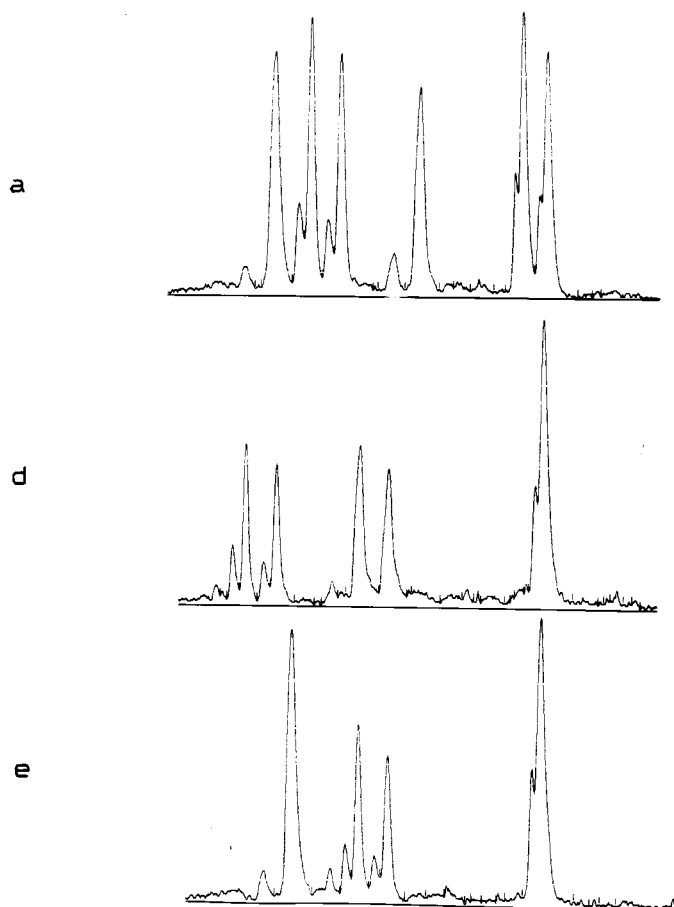


fig 20 : étude du polymorphisme de l'intron 40
(par densitométrie de l'autoradiographie
précédente (fig 12))

ALLELE* LENGTH (bp)	744	748	752						756					
			744	748	752	756	760	764	768	772	776			
ALU I FRAGMENTS (bp)	272 236 236	272 240 236	272 240 240	272 244 236	272 248 228	276 240 236	276 244 232	276 248 240	272 248 236	268 248 240	276 244 232	276 252 228	276 248 232	276 244 236
NUMBER OF ALLELES**	7	9	1	2	2	1	2	4	1	1	5	1	1	

ALLELE* LENGTH (bp)	760				764				768				
	760	764	768	772	764	768	772	776	768	772	776	780	784
276 240 240	276 248 236	276 240 236	284 240 236	276 248 240	276 256 232	276 244 244	280 244 240	276 248 244	280 244 240	276 252 240	276 248 240	280 252 236	280 248 236
1	2	4	1	4	3	1	2	1	2	1	2	2	2

ALLELE* LENGTH (bp)	772							776						
	772	776	780	784	788	792	796	776	780	784	788	792	796	
284 244 240	276 248 248	276 252 244	276 256 240	284 248 244	284 248 240	292 244 236	292 244 228	276 252 244	280 248 244	276 256 244	280 248 240	284 252 240	288 244 244	
1	7	5	1	1	4	2	3	2	2	2	1	1	1	

Tableau 6-a : allèles caractérisés dans un échantillon de

89 individus non apparentés.

* taille des fragments amplifiés déduite de la taille des fragments de restriction Alu I.

** : nombre d'allèles ayant un profil de restriction Alu I identiques.

ALLELE* LENGTH (bp)	780										784			
	776			784				792						
ALU I FRAGMENTS (bp)	288	296	276	280	280	284	288	288	296	296	296	300	272	280
	240	244	256	252	256	252	248	248	244	248	248	240	268	256
	240	236	248	248	244	244	244	244	240	236	236	240	244	248
NUMBER OF ALLELES**	1	3	1	2	2	1	4	1	1	2	1	1	2	2

	784										788				792			
	292	296	296	296	300	304	280	292	296	300	304	280	292	280	292	300		
248	244	248	252	244	244	256	256	248	244	248	256	256	256	252	248			
244	244	240	236	240	236	252	240	244	244	236	240	244	236	248	244			
1	1	3	5	4	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1			

	800				804				808				812				816			
	792	796	800	800	804	804	804	808	808	808	812	812	816	816	820					
304	296	296	308	292	300	296	300	300	304	308	308	308	308	308						
244	252	276	248	280	252	260	256	280	276	276	280	280	280	280						
244	248	228	244	232	252	252	252	228	228	228	228	228	228	232						
3	1	3	2	1	1	1	1	2	3	3	1	2	1	1						

Tableau 6- b : allèles caractérisés dans un échantillon de 89 individus non apparentés.

* taille des fragments amplifiés déduite de la taille des fragments de restriction Alu I.

** : nombre d'allèles ayant un profil de restriction Alu I identiques.

L'analyse des résultats obtenus montre que :

- * après digestion par l'endonucléase de restriction Alu I chaque allèle est caractérisé par trois fragments de taille comprise entre 228 et 308 pb, dont un de taille supérieure à 260 pb.

- * la taille de chaque allèle, déterminée par addition des tailles des fragments digérés, est comprise entre 744 et 820 pb.

- * la transmission des allèles est de type Mendélienne, co-dominante.

- * l'étude de 3 générations dans 9 familles et de 2 générations dans 31 familles n'a montré à ce jour aucun phénomène de recombinaison dans cette séquence.

La variation de la taille du fragment amplifié, toujours multiple de 4 pb, montre que ce polymorphisme est bien dû à la répétition d'un tétranucléotide comme annoncé par Peake et al. (107) et Mancuso et al. (85). De plus, des fragments amplifiés de taille identique peuvent présenter des profils différents révélés après digestion par l'endonucléase de restriction Alu I. Ce polymorphisme résulte donc à la fois du nombre et de la position des répétitions du tétranucléotide ATCT.

Ces résultats font l'objet d'une publication soumise à Nucleic Acids Research, insérée page 95 à 96.

**A MULTI-ALLELIC POLYMORPHISM OF THE VON WILLEBRAND FACTOR
GENE DETECTED BY P.C.R. : CHARACTERISATION OF 94 ALLELES IN
101 UNRELATED INDIVIDUALS**

MERCIER B., GAUCHER C., MAZURIER C.
Laboratoire de Recherche sur l'Hemostase
Centre Regional de Transfusion Sanguine
(director : Dr J.J. HUART)
21 , rue Camille Guerin - 59012 - LILLE - FRANCE

Source / description : A variable number of tandem repeats (VNTR) of an ATCT sequence has been described in the intron 40 of the von Willebrand factor gene (1,2,3). The whole VNTR region was amplified using two primers : W31 = GCCCTAGTGGATGATA AGAATAATCAG and W32 = GCAGACTTCTACTGTTTTAGGTAAGTG, corresponding respectively to NT 1639-1665 and NT 2404-2378 (1).

Methods : PCR amplifications (4) (30 cycles : 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C) were performed in a 100 µl reaction mixture containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.5 mM Mg Cl₂, 0.1 mg/ml gelatin, 15 µM dNTPs, 50 pmoles of each primer, 5 µCi of α³²S dATP and 0.5 µg of genomic DNA. Direct amplification from whole blood, without DNA extraction, can also be performed (5). Following direct digestion by Alu I restriction endonuclease, the labelled samples were electrophoresed for 5 h at 2000 V on a 6 % sequencing gel and autoradiographed overnight. A control plasmid sequencing reaction was used as a size marker.

Polymorphism : Based on the presence of two Alu I restriction sites in the amplified sequence as mentioned in the published vWF gene sequence data (1), each allele was characterized by the combination of three restriction fragments ranging between 228 and 308 bp, one of which being always larger than 264 bp.

Frequency : This method allowed us to characterize, on the basis of both the number and position of the ATCT repeats, 94 alleles in 101 unrelated Caucasians. The alleles frequency ranges between 1/202 for the 44 less frequent (example : 296 + 260 + 252 bp) and 9/202 for the most frequent (272 + 240 + 236 bp). According to our results, the calculated heterozygosity rate is 0.98.

Chromosomal localization : 12p12-12pter (6)

Mendelian inheritance : Co-dominant segregation shown in 40 families. Our data did not show any recombination event in all

the meiosis corresponding to 3 generations in 9 families and to 2 generations in 31 families.

Commentary : Other applications of this multi-allelic polymorphism than the study of the inheritance and antenatal diagnosis of von Willebrand's disease are of interest : paternity testing, detection of samples contamination and even forensic studies as the results can be obtained in less than 48 h and subsequently confirmed by fingerprinting.

References : (1) Mancuso D.J. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 19514-19527. (2) Peake et al. (1990) Blood, 76, 555-561. (3) Ploos Van Amstel HK. et al. (1990) Nucl. Acid. Res. 18, 4957. (4) Saiki RK. et al. (1985) Science, 230, 1350-1354. (5) Mercier et al. (1990) Nucl. Acid. Res. 18, 5908. (6) Ginsburg d. et al. (1985) Science, 228, 1401-1426.

Article soumis à Nucleic Acids Research

3 - Applications à l'étude de familles de vWD :

Ce polymorphisme s'est avéré informatif pour les 15 familles de patients atteints de maladie de Willebrand étudiées. Nous nous limiterons à présenter un exemple de chaque type de maladie de vWD, et à discuter certains de ces résultats. La nomenclature utilisée pour identifier les allèles étant arbitraire, elle ne correspond pas à la même association de fragments de restriction d'une famille à l'autre.

a - Type I : famille S

résultat : voir page 98

Dans cette famille la maladie, à expression dominante, est associée à l'allèle A. En effet les 6 enfants symptomatiques ont hérité de l'allèle A de leur mère qui est elle même atteinte. De plus, cette étude révèle un problème de paternité concernant l'individu II-3 (voir page 108).

b - Type II B : famille M

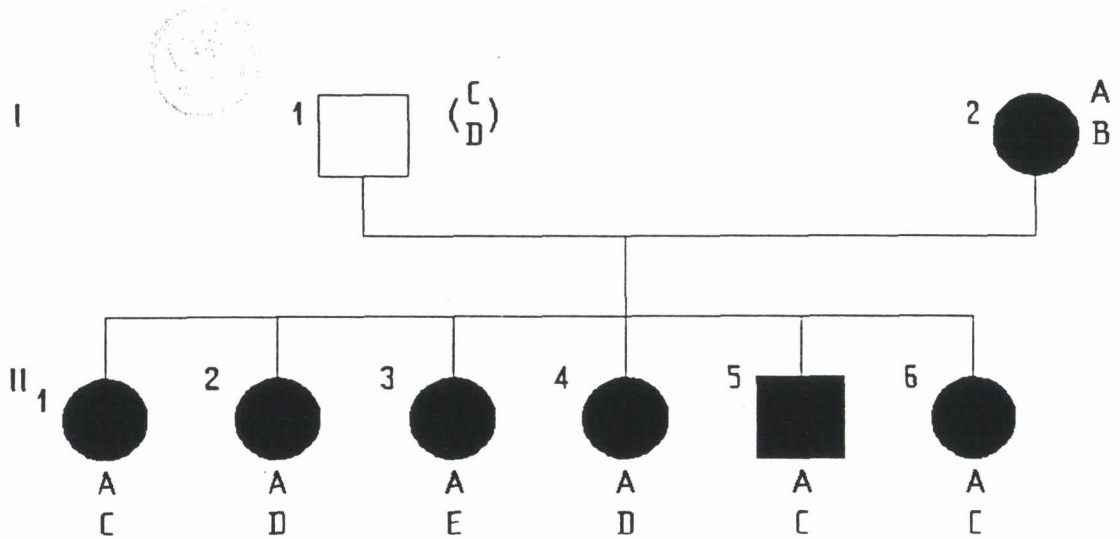
résultat : voir page 99

Dans cette famille la maladie, dominante, est associée à l'allèle B.

c - Type II C : famille B

résultat : voir page 101

Dans cette famille la maladie, probablement de type récessif, est associée aux deux allèles B et C. En effet l'étude des individus II-2, II-4 et III-3, présentant



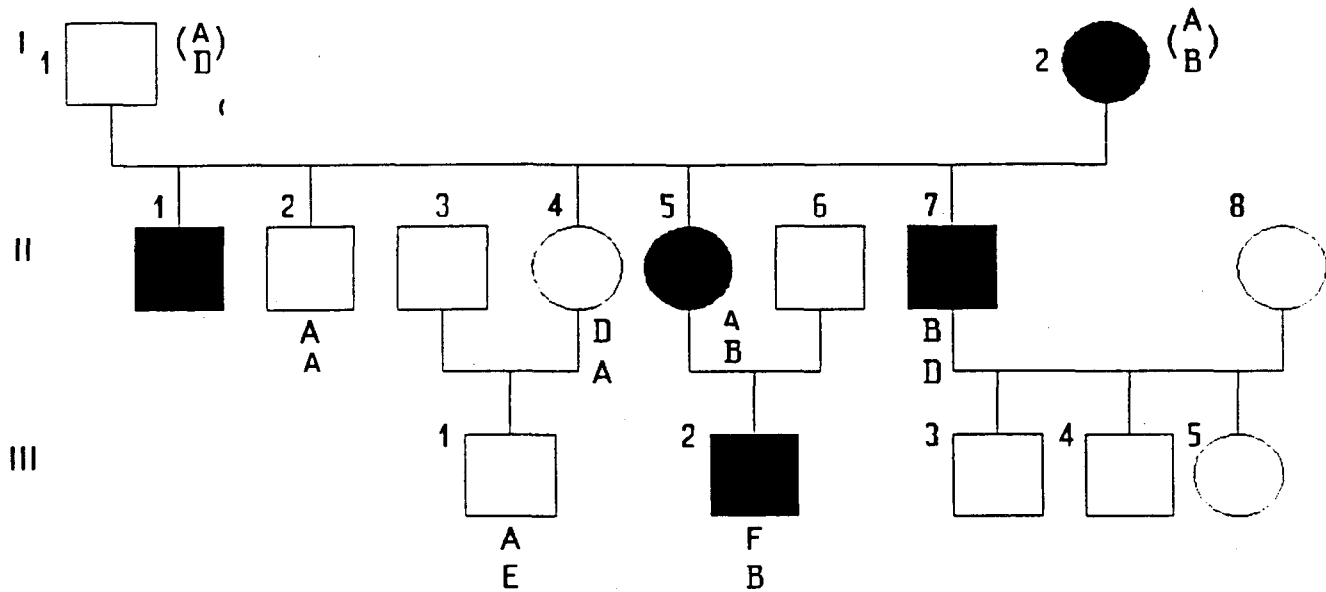
arbre généalogique de la famille S (vWD type I).
Le génotype entre parenthèses est déduit de celui des autres individus

individu n°	I-2	II-1	II-2	II-3	II-4	II-5	II-6
fragments	304	304	304	304	304	304	304
de digestions	276 ²	276 ²	276	276	276	276 ²	276 ²
(pb)	256	248	244 ²	244	244 ²	248	248
	232	240	240	240	240	240	240
	228	228	228	228	228	228	228
interprétation	304 276 228 = A	A	A	A	A	A	A
	276 256 232 = B	276 248 240 = C	296 244 ² = D	292 244 240 = E	D	C	C

Fig 21 : analyse du polymorphisme de l'intron 40 du gène du vWF dans la famille S, vWD de type I.

272² : la bande de 272 pb est présente en double

remarque : ce polymorphisme révèle un "problème de paternité" concernant l'individu II-3 (voir page 104).



arbre généalogique de la famille M (vWD type II B)
 Les génotypes entre parenthèses sont déduits de celui
 des autres individus

individu n°	II-2	II-4	II-5	II-7	III-1	III-2
fragments			300	300	296	300
de	276 ²	276 ²	276	276	276	276
digestions	248 ²	248	248	248	248 ²	248
(pb)	240 ²	244	244	244 ²	244	244
	240	240	240 ²	240	240	240 ²
interprétation	276 248 240 = A	A	B	B	A	B
	276 248 240 = A	D	A	D	296 248 244 = E	278 248 240 = F

Fig 22 : analyse du polymorphisme de l'intron 40 du gène du
 vWF dans la famille M.

tous les trois une anomalie de leur vWF détectée par un double pic en immuno-électrophorèse bidimensionnelle, montre que le gène caractérisé par l'allèle C est porteur de ce défaut. Chez l'individu III-4, le gène caractérisé par l'allèle B, et hérité de son père, est très probablement porteur d'une seconde anomalie.

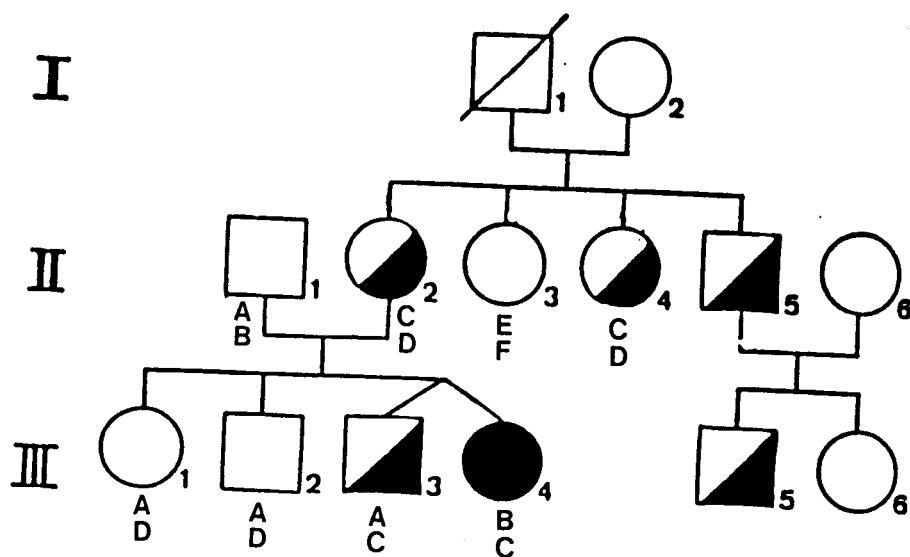
d - Type II "Normandy" :

* Famille P. : résultat page 102

Dans cette famille la maladie, récessive, est associée aux allèles A et C. L'étude phénotypique des sujets hétérozygotes a démontré une diminution de la capacité de fixation du FVIII chez ces individus (91). La diminution de la capacité de fixation du FVIII (50%) observée chez les parents (I-1 et I-2) révèle qu'ils sont tous deux porteurs d'une anomalie. L'absence de fixation observée chez la patiente II-2 permet d'identifier les allèles porteurs des anomalies chez ses parents : allèle A de sa mère et allèle C de son père.

* Famille D. : résultat page 104 et 105

Dans cette famille la maladie, récessive, est associée aux allèles B et G. L'étude phénotypique a montré une absence de fixation du FVIII chez les patients III-2, III-4 et III-6, et une diminution de la capacité de fixation du FVIII chez les sujets hétérozygotes I-2, II-1, II-5, II-7, II-8 et III-3 (91). Ces résultats nous ont permis de conclure que les allèles B et G sont, dans cette famille, tous deux porteurs d'une anomalie récessive

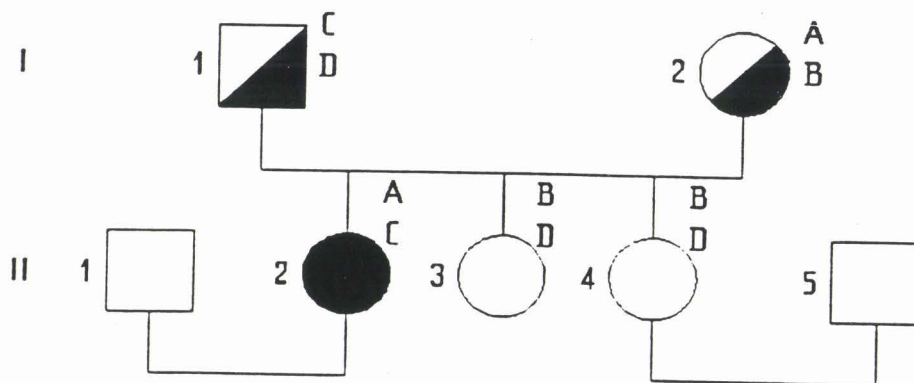


arbre généalogique de la famille B (vWD type II C)

●: individu dont le profil immuno électrophorétique du vWF présente un double pic

individu n°	II-1	II-2	II-3	II-4	III-1	III-2	III-3	III-4
fragments de restriction (pb)	276 ² 252 248 240 228	276 272 248 240 ² 236	312 280 ² 244 ² 228	276 272 248 240 ² 236	276 ² 248 ² 240 236	276 ² 248 ² 240 236	276 272 248 240 ²	276 272 252 240 ² 228
interprétation	276 248 240 = A	272 240 240 = C	E	C	A	A	A	B
	276 252 228 = B	276 248 236 = D	F	D	D	D	C	C

Fig 23 : analyse du polymorphisme de l'intron 40 du gène du vWF dans la famille B.



arbre généalogique de la famille P (vWD type "Normandy").

- : 0 % de capacité à fixer le FVIII
- ◐: 50 % de capacité à fixer le FVIII
- : 100 % de capacité à fixer le FVIII

individu n°	I-1	I-2	II-2	II-3	II-4
fragments de digestions (pb)	280 ²	296	296	280	280
		276	280	280	276
	256 ²	256	256	256	256
	252	252 ²	252	252 ²	252 ²
	244	248	248	244	244
	244	244	244	244	244
interprétation	280 256 244 = C	296 252 248 = A	A	B	B
	280 256 252 = D	276 252 244 = B	C	D	D

Fig 24 : analyse du polymorphisme de l'intron 40 du gène du vWF dans la famille P.

responsable de la diminution de la capacité de fixation du FVIII.

e - Type III : famille W

résultat : voir page 106

Dans cette famille, dont les données phénotypiques sont résumées dans le Tableau 7 page 107, le patient II-1 présente une forme sévère de la maladie alors que ses parents sont asymptomatiques. C'est pourquoi nous l'avons considéré comme appartenant au type III (Tableau 2 page 30). La mise en évidence d'une forme modérée de la maladie chez son neveu, III-1, peut s'expliquer par le fait que ce dernier soit hétérozygote pour une anomalie récessive présente à l'état homozygote chez II-1. En effet, on sait que les sujets hétérozygotes dans les familles de vWD de type III peuvent présenter des taux normaux ou modérément diminués de vWF. La présence chez III-1 d'une autre anomalie du vWF transmise par son père II-4 pourrait être une autre explication, les sujets hétérozygotes du type III étant asymptomatiques. L'étude récente des 2 filles du malade II-1, qui ne présentent aucun syndrome hémorragique, a révélé qu'elles aussi avaient un déficit modéré en vWF. Ces résultats suggèrent donc que l'allèle A est associé au déficit modéré en vWF observé chez III-1, III-3 et III-4. Cependant seul l'individu III-1 (agé de 13 ans) est symptomatique, les individus III-3 et III-4, agées respectivement de 8 et 6 ans, étant asymptomatiques. L'anomalie associée à cet allèle A pourrait être soit :

* dominante, apparentée au type I, sans toutefois être toujours symptomatique. Des variations

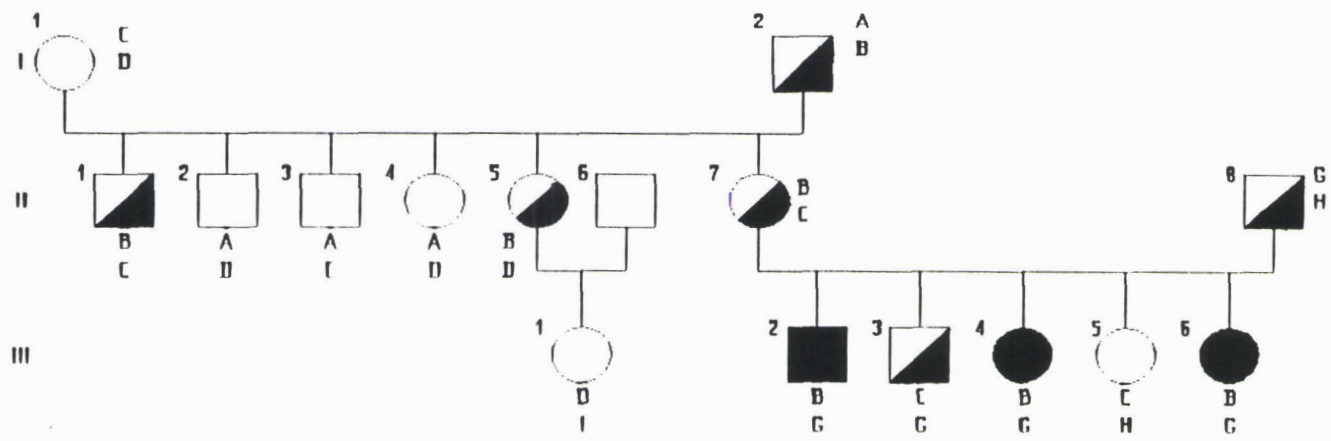
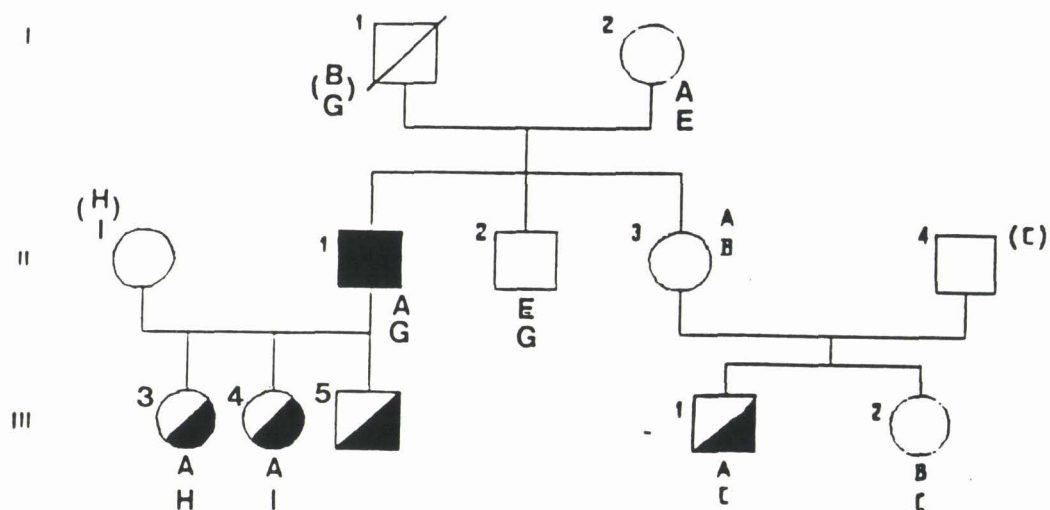


Fig 25-b : arbre généalogique de la famille D, vWD de type "Normandy".

- : 0 % de capacité à fixer le FVIII
- ◐ : 50 % de capacité à fixer le FVIII
- : 100 % de capacité à fixer le FVIII

INDIVIDUS	I-1	I-2	II-1	II-2	II-3	II-4	II-5	II-7	II-8	III-1	III-2	III-3	III-4	III-5	III-6
FRAGMENTS DE DIGESTION (bp)	296	296	296 ²		296		296	296 ²	308	304				308	
	276	276		276 ²	276	276 ²	276	276	296	276	296 ²	296 ²	296 ²	296	296 ²
	252	252 ²	252	252 ²	252 ²	252 ²	252	252	276	276		252		276	276
	248	248 ²	248	248 ²	248 ²	248 ²	248 ²	248	248	248	248		248		248
	244			244		244	244	244	244	244 ²	244 ²	244	244 ²	244	244 ²
		240	240				240	240	240		240 ²	240	240 ²		240 ²
	232		232		232			232	228	236		232		232	228
interprétation	296	276		A	A	A	B	B	296	D	B	C	B	C	B
	252	252	B						244						
	232	248							240						
	=C	=A							=G						
	276	296		D	C	D	D	C	308	304					
	248	248	C						276	244	G	G	G	H	G
	244	240							228	236					
	=D	=B							=H	=I					

Fig 25-a : étude du polymorphisme de l'intron 40 du gène du vWF dans la famille D, vWD de type "Normandy".



arbre généalogique de la famille W.

■ : déficit sévère en vWF

◐ : déficit modéré en vWF

Seuls les individus II-1 et III-1 sont symptomatiques.

III-5 : exploré 1 seule fois à la naissance

individu n°	I-2	II-1	II-2	II-3	III-1	III-2	III-3	III-4
fragments	300	292	300				296	
de	276	276	292	276 ²	276	276	276	276 ²
digestions	252	252	252	252	272	272	252	252
(pb)	248	248	248	248	244	248	248	248 ²
	244 ²	244 ²	244 ²	244	244	244	244	244
				240	236 ²	240	236	
interprétation	276 252 244 = A	A	E	A	A	B	A	A
	300	292		276	272		296	276
	248	244	G	248	236	C	248	248
	244	244		240	236		236	248
	= E	= G		= B	= C		= H	= I

Fig 26 : analyse du polymorphisme de l'intron 40 du gène du vWF dans la famille W.

d'expression du vWF en fonction de l'âge, déjà décrites, pourraient en effet expliquer que les individus III-3 et III-4 (des enfants), tous deux porteurs de l'allèle A aient des taux nettement diminués, alors que les individus I-2 et II-3 (des adultes), eux aussi porteurs de l'allèle A, présentent des taux seulement modérément diminués. Dans ce cas, l'individu II-1 aurait hérité d'une deuxième anomalie portée par l'allèle G de son père.

* récessive, expliquant l'absence de syndromes hémorragiques chez les individus I-2, II-3, III-3 et III-4. L'individu II-1 aurait alors hérité de son père une deuxième anomalie, probablement récessive, la combinaison des deux gènes morbides expliquant la forme sévère observée chez cet individu. L'individu III-1 aurait lui-aussi hérité une deuxième anomalie, probablement récessive, associé à l'allèle C de son père et à l'origine de son syndrome hémorragique modéré.

individu	I-2	II-1	II-2	II-3	III-1	III-2	III-3	III-4
vWF:Ag	63	< 1	120	55	20	105	32	23
vWF:RCo	40	10	95	57	21	70	25	24

Tableau 7 : données phénotypiques des individus de la famille W.

4 - Autres applications potentielles :

a - Contrôle de paternité : grâce à sa forte variabilité, ce polymorphisme peut révéler un "problème de paternité" lors d'études familiales.

exemple : cas de la famille S (page 98)

Ne disposant pas d'échantillon de l'individu I-1 pour cette étude, nous avons déduit les allèles associés à chacun de ses gènes de l'étude du génotype de ses enfants, en tenant compte de l'hypothèse la plus probable (Fig. 21 page 98). Le profil de digestion obtenu montre que l'individu II-3 a hérité l'allèle A (chromosome morbide) de sa mère, mais que le deuxième allèle ne provient probablement pas de l'individu I-1 (son père supposé). L'étude du polymorphisme multi-allélique Bcl I du FVIII (voir page 20), situé sur le chromosome X, a confirmé ce résultat.

Dans le cadre d'études de familles d'hémophiles, nous utilisons donc ce polymorphisme pour vérifier les "problèmes de paternité" révélés au cours de l'analyse de ségrégation des gènes du FVIII ou du FIX.

b - Détection d'ADN contaminant

La principale limite de la PCR étant le risque de contamination, nous avons testé le seuil de sensibilité de notre méthode de détection de ce polymorphisme. Un ADN contaminant dilué 100 fois dans un autre ADN peut être mis en évidence grâce à la révélation simultanée des fragments de restriction spécifiques de chaque ADN, après 5 jours d'autoradiographie.

c - Médecine légale

Le résultat pouvant être obtenu en moins de 48 h, l'analyse de ce polymorphisme pourrait être menée

durant le délai légal, en France, de garde à vue. Les résultats pourraient ensuite être confirmés par l'analyse des empreintes génétiques déjà utilisée en médecine légale, qui nécessite souvent plusieurs semaines de délai.

5 - Discussion

L'étude par P.C.R. du fragment amplifié contenant la totalité de la région à VNTR située dans l'intron 40 du gène du vWF nous a permis de caractériser 87 allèles différents chez 89 individus non apparentés. Dans leurs études Peake et al. (107) et Ploos van Amstel et al. (111) n'ont pu identifier que 8 et 6 allèles respectivement, mais sur un nombre d'individus plus restreint (respectivement 53 et 24). Leur méthode d'étude, analyse directe sur gel d'acrylamide de la taille du fragment amplifié, est plus aisée et plus rapide. Toutefois, reposant sur l'analyse d'une partie seulement de la région polymorphe, elle perd en informativité et ces auteurs doivent parfois étudier d'autres polymorphismes de ce gène, par Southern blot, pour pouvoir rendre un diagnostic. Dans leur premier article Peake et al. décrivent la présence d'un "doublet" au niveau des fragments obtenus, ce résultat est donc identique à celui que nous observons. Ces auteurs proposent l'hypothèse suivante pour expliquer ce phénomène: amplification d'un fragment non spécifique à partir d'une séquence quasi-homologue à celle de la VNTR étudiée, située sur une autre partie du génome. Nos amorces étant choisies dans l'intron hors de la région de type VNTR, il faudrait qu'une séquence homologue à celle de l'intron 40 existe dans le génome

humain pour expliquer ce résultat. Une telle séquence n'a pas, à ce jour, été mise en évidence. D'autres hypothèses peuvent être envisagées :

- * lors de l'amplification, la Taq polymérase commet une erreur au niveau des répétitions du tétranucléotide ATCT : elle "oublie" un ou deux nucléotides.

- * dégradation du fragment amplifié, après digestion, par une activité exonucléasique.

Une erreur de la Taq polymérase lors de la répllication paraît peu probable. Elle devrait entraîner soit l'oubli soit l'ajout de nucléotides. Or, nous n'avons jamais observé de fragments de taille supérieure aux fragments spécifiques. Par contre, l'hypothèse d'une dégradation d'ûe à une activité exonucléasique semble la plus crédible, malgré l'échec de tentatives d'inhibition par l'addition d'EDTA. Il faut cependant noter que ce profil ne gêne en aucun cas l'interprétation du résultat vu la différence d'intensité respective des fragments spécifiques et des fragments dégradés..

Après digestion par l'endonucléase de restriction Alu I chaque allèle est caractérisé par trois fragments de restriction. Il semble que deux sites spécifiques de cette enzyme soient donc toujours présents dans le fragment amplifié, malgré leur localisation dans la région variable de cette séquence. Comme les trois fragments de restriction obtenus sont polymorphes, nous proposons l'hypothèse

suivante : les deux sites de restriction seraient constants et le polymorphisme ne serait pas du à un seul bloc variable (NT 1683 à 2347) mais à au moins trois séquences variables plus petites (Fig. 27, p. 111).

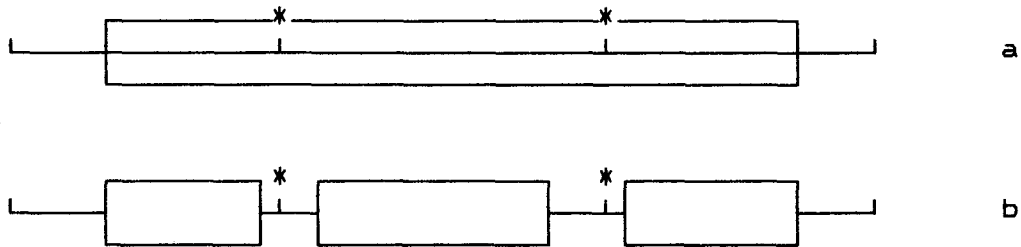


Fig. 27 : schéma du fragment amplifié
 a : selon la séquence publiée (85)
 b : hypothèse concernant la position des séquences variables
 * : site de restriction Alu I
 les rectangles correspondent aux régions variables

Le séquençage de plusieurs allèles devrait nous permettre de vérifier ou d'infirmer cette hypothèse. Si cette hypothèse s'avère erronée, il faudra alors considérer que les sites de restrictions Alu I sont eux aussi polymorphes, pouvant être déplacés ou supprimés par l'insertion d'une séquence ATCT. Toutefois cette hypothèse semble peu probable car, dans ce cas, l'étude des 89 personnes non apparentées aurait dû permettre l'observation de fragments d'environ 500 pb correspondant à la suppression d'un site de restriction Alu I.

Lors de notre étude, nous n'avons pas observé de phénomène de recombinaison dans cette région variable de l'ADN distante d'environ 140 kb de l'extrémité 5' du gène

et d'environ 40 kb de l'extrémité 3' du gène du vWF. Ce résultat est apparemment en contradiction avec une étude concernant la fréquence des recombinaisons dans 5 autres VNTR (66). En effet, les résultats obtenus par cette équipe montrent que la fréquence des recombinaisons dans les VNTRs, qui peut atteindre jusqu'à 5 %, est beaucoup plus grande que celle observée dans d'autres régions du génome. Seule l'étude d'un grand nombre de familles, si possible avec au moins 4 générations, permettra de préciser si les recombinaisons au niveau de cette région variable de l'intron 40 du gène du vWF ont une fréquence moindre. Dans un résumé du congrès de la Société Internationale de Thrombose et Hémostase, à Tokyo en 1989, Murray et al. ont rapporté que, pour 2 familles (de type I et IIB), les allèles du polymorphisme VNTR du gène du vWF analysés selon le protocole de Peake et al. (107) présentaient une ségrégation différente de celle de la maladie. Les auteurs ont alors envisagé 2 hypothèses : soit 1 recombinaison entre la région polymorphe et l'anomalie, soit que cette anomalie soit située sur un autre gène impliqué dans la régulation de l'expression du vWF.

Bien que le grand nombre d'allèles identifiés ne nous permette pas de calculer précisément les fréquences de chaque allèle ou le taux d'hétérozygotie de façon exacte, nous avons néanmoins cherché une estimation selon la formule : $(n_1 + n_2 + \dots + n_{87})^2 = 1$, où n est la fréquence de chaque allèle. D'après cette formule le taux d'hétérozygotie serait de 0,98. Ce résultat n'est

qu'indicatif : il correspond à une estimation effectuée à partir des éléments actuellement en notre possession, et non pas à un calcul exact car les fréquences utilisées sont trop imprécises. Il est en effet probable que les 43 allèles ayant une fréquence identique (de 1/178) d'après nos résultats n'auraient pas la même prévalence si l'étude pouvait être élargie à un plus grand nombre d'individus.

Ce polymorphisme, ainsi caractérisé selon le nombre et la position des répétitions de la séquence ATCT, est le plus variable décrit sur le vWF et l'un des plus variables actuellement décrit sur le génome humain (68b). Nous avons montré qu'il permet de suivre la transmission des gènes morbides au sein d'une famille. Ces études de ségrégation du gène du vWF ont permis de confirmer le caractère dominant de la maladie de Willebrand de type I. Par contre pour le type II, considéré comme dominant dans la majorité des cas, nos résultats montrent que la transmission des sous-types IIC et "Normandy" est, dans les familles étudiées, de type récessive. Ce polymorphisme s'est révélé informatif dans toutes les familles étudiées à ce jour soit 15 familles de vWD et plus de 25 familles d'hémophiles. D'autres applications sont soit déjà utilisées au laboratoire (tests de paternité, détection de contamination) soit envisageables (médecine légale).

III - CARACTERISATION DE VARIANTS DE TYPE "NORMANDY"

1 - Description

Un nouveau variant de la maladie de Willebrand a été découvert, dans le laboratoire. Il se caractérise par une absence d'anomalie quantitative du vWF plasmatique et plaquettaire, une interaction normale du vWF avec les plaquettes, un profil multimérique normal mais, par contre, un déficit en FVIII dû à une anomalie de fixation de ce facteur sur le vWF (92,93). Ces caractéristiques phénotypiques rendent le diagnostic de ce type "Normandy" difficile car il peut être diagnostiqué à tort comme hémophile A (temps de saignement normaux ou subnormaux). Dans ce cas, le traitement administré au patient ne sera pas adapté : en effet l'injection de concentré de FVIII (préparation maintenant dépourvue de vWF) ne permettra pas de corriger de façon durable le déficit en FVIII de ce type de malade (91). L'étude familiale peut, éventuellement, montrer que la transmission de la maladie n'est pas autosomale, mais seule l'étude de l'interaction FVIII/vWF permet le diagnostic. Nous avons entrepris l'analyse par biologie moléculaire du premier variant (B.G.) appelé "Normandy". Trois autres patients (D.S., P.C., M.M.), non apparentés, présentant le même type d'anomalie ont depuis été étudiés. Deux de ces patients (D.S. et P.C.) sont originaires de la même région du Portugal.

Le site principal de fixation du facteur VIII sur le facteur Willebrand étant localisé dans les 272 premiers acides aminés du facteur Willebrand mature (33,34,67,127), la région du gène codant les 311 premiers

acides aminés a été analysée chez ces malades. L'amplification puis le séquençage direct des 7 exons correspondant, soit un total d'environ 1,8 kb par individu, ont ainsi permis de caractériser 3 mutations responsables de la maladie (voir Tableau 9 page 135). La position des mutations identifiées est indiquée selon la numérotation de l'ADN complémentaire du vWF, le n° 1 correspondant au 1^{er} nucléotide du codon de la Met initiale du pré-pro-Willebrand. La numérotation des acide aminé est celle de la protéine mature.

2 - Etude de la patiente B.G.

Dans cette famille il n'y a aucun antécédant hémorragique connu. Il est à noter que les parents de cette malade, tous deux pupilles de la nation ont appris qu'ils étaient cousins au troisième degré.

a - Données phénotypiques :

F VIII:C = 6-8 %

F VIII:Ag = 8-10 %

vWF:Ag = 65-100 %

b - Résultats :

Le séquençage de l'exon 18 a révélé une mutation homozygote (ACG ---> ATG) du nucléotide 2372, prédisant la substitution de la thréonine n° 28 de la sous-unité du vWF mature en méthionine (voir article page 118 et tableau 9 page 135). Cette mutation supprime un site de restriction Mae II (Fig. 28, page 116).

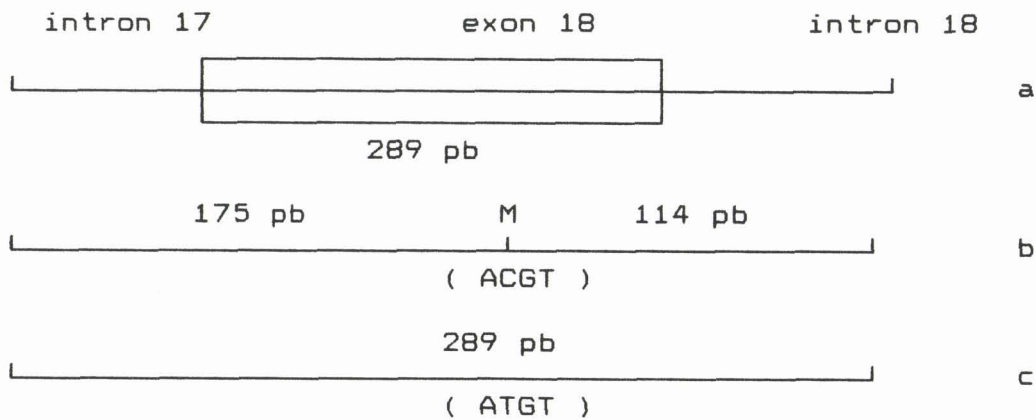


Fig. 28 : schéma du fragment amplifié contenant l'exon 18
 a : fragment amplifié
 b : allele normal
 c : allele muté
 M : site de restriction Mae II

Pour déterminer si cette mutation était à l'origine de la maladie ou si elle correspondait à un polymorphisme silencieux, l'exon 18 de 30 témoins a été amplifié puis digéré par l'endonucléase de restriction Mae II. La présence du site Mae II chez les témoins analysés suggère que la mutation observée pourrait être effectivement responsable de l'anomalie fonctionnelle du vWF.

L'analyse du polymorphisme de l'intron 40 du gène du vWF de la malade présente un profil de digestion avec uniquement 3 fragments de restriction pouvant correspondre à un état homozygote (tableau 9 page 135). On peut en déduire, étant donné la consanguinité, que les parents de cette patiente présentent tous deux le même gène morbide, caractérisé par l'allèle A. Seule la patiente, homozygote pour ce chromosome morbide présente une symptomatologie hémorragique, son fils dont le taux de FVIII:Ag est diminué et qui a été trouvé hétérozygote par

séquençage et digestion par l'endonucléase de restriction Mae II, est asymptomatique. Ceci indique que la transmission de la maladie est, dans cette famille, de type récessive.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans Blood, insérée page 118 à 134.

THE "NORMANDY" VARIANT OF VON WILLEBRAND'S DISEASE :
CHARACTERIZATION OF A POINT MUTATION
IN THE VON WILLEBRAND FACTOR GENE

Authors : C. Gaucher, S. Jorieux, B. Mercier, D. Oufkir, C. Mazurier.

Institution : Laboratoire de Recherche sur l'Hémostase,

Centre Régional de Transfusion Sanguine

(C.R.T.S., Director : Dr J.J. Huart), Lille, France.

Summary

We previously reported a functional defect of von Willebrand factor (vWf) in a new variant of von Willebrand's disease (vWD) tentatively named vWD "Normandy". The present work has attempted to characterize the molecular abnormality of this vWf which fails to bind factor VIII (FVIII).

The immunopurified vWf from normal and patient's plasma were digested by trypsin and the resulting peptides were compared. The electrophoresis of "vWf Normandy" showed a shift in the band corresponding to a polypeptide from amino acid (aa) 1 to 272. Consequently, we undertook the molecular analysis of the portion of the vWf gene of this patient encoding this aa sequence. Exons 18-24 were amplified by the use of polymerase chain reaction (PCR) and their nucleotide sequences corresponding to 1.8 kb were determined. Our analysis showed a point mutation C to T at codon 791, resulting in the substitution of Methionine for Threonine at position 28 of the mature vWf subunit. As this nucleotide substitution destroyed a MaeII restriction site, this mutation was conveniently sought in various individual DNAs. The patterns obtained were consistent with the homozygous and heterozygous state of this mutation in the patient and in her son respectively, and with its absence in 28 normal individuals. We conclude that Threonine at position 28 in plasma vWf may be crucial for the conformation and FVIII-binding capacity of its cystine-rich N-terminal domain.

Introduction

Von Willebrand factor (vWf) is a large multimeric glycoprotein found in plasma and in platelets which is synthesized by endothelial cells and megakaryocytes. Besides its major role as a mediator of initial platelet adhesion to vascular subendothelium, vWf is also the carrier of factor VIII (FVIII) in plasma (1, 2). The association of vWf with FVIII has been shown "in vitro" to stabilize the coagulant activity of both human (3) and recombinant (4,5) FVIII. Furthermore, clinical observations in patients confirm the importance of normal vWf in prolonging FVIII half-life (6, 7).

The human vWf gene has been studied in some detail and is located on chromosome 12 (8, 9). It is \approx 178 kb in length and contains 52 exons, the intron boundaries of which were recently determined, \approx 19 % of the gene being sequenced (10). The 9 kb vWf mRNA encodes a 2813 amino acid (aa) precursor consisting of a 22 aa signal peptide, a 741 aa propeptide and a 2050 aa mature subunit. Functional domains involved in binding to platelet membrane glycoproteins, collagen and heparin have been localized on the vWf subunit (reviewed in reference 11). More recently, a major FVIII-binding domain of vWf was characterized on the NH₂-terminal region of mature vWF. FVIII binds to Sp fragment III' (aa 1-910), but not to Sp fragments I (aa 911-1365) or II (aa 1366-2050), obtained by digestion of vWf with *Staphylococcus aureus* V8 protease (12-14). Furthermore, this function is maintained on a tryptic fragment (SpIII-T4) containing the amino-terminal 272 aa of vWf (14).

Von Willebrand disease (vWD), the most common inherited bleeding disorder, is heterogenous and originates from either quantitative (vWD types III and I) or qualitative (vWD type II) alterations of vWf (15). Many phenotypic subtypes of vWD have been distinguished, generally according to the multimeric profile of

plasma and platelet vWf (16). Depending on the disease type or subtype, the inheritance has been found either dominant (type I, subtypes IIA and IIB) or recessive (type III and subtype IIC). The cause of vWD at the level of gene structure is known in only a few families. Total or partial gene deletions for vWD type III (17-19) as well as single point mutations for vWD types IIA (20, 21) and IIB (22) have been reported.

In an earlier article (23), we described a new variant form of vWD, tentatively named vWD "Normandy", in a female patient with FVIII deficiency but normal primary hemostasis. Her plasma vWf, which did not present any quantitative or multimerization abnormality, was shown to be unable to bind FVIII. This paper reports the study we have performed to characterize the underlying molecular pathology of this patient.

Patient and Methods

Case report

For a complete data report refer to earlier publication (23). A 50-year-old French woman with a lifelong history of bleeding was referred to us in August 1988. Investigations confirmed FVIII deficiency (5 to 8 IU/dl) but showed normal levels of vWf antigen and ristocetin cofactor activity and normal vWf multimeric pattern. FVIII binding assays showed that the patient's vWf, in contrast to normal vWf, was unable to bind FVIII. Her two children, a son and a daughter, as well as her parents who were third cousins, were said to have no bleeding history. However, plasma from the patient's son showed both moderate FVIII deficiency and FVIII-binding values intermediate between the normal values and the patient's values (data not shown).

Antibodies :

Monoclonal antibody (MoAb)-239 to human vWf, prepared in collaboration with Immunotech (Marseilles, France), recognizes all the multimeric forms of vWf (24). MoAb-418 was a generous gift of D. Meyer (INSERM U143, Paris, France) ; it specifically inhibits the binding of FVIII to vWf and reacts with the unreduced N-terminal tryptic (aa 1-272) or plasmic (aa 1-298) fragment of vWf subunit (12). Its epitope was further localized to the first 106 aa of the mature vWf subunit (25). Two other MoAbs, obtained by immunization of Balb/c mice with SpIII-T4 fragment (26) were also used. MoAb-175-35A8 inhibits the FVIII binding to vWf and recognizes both reduced and unreduced SpIII-T4 fragment ; MoAb-175-31H3 does not inhibit FVIII/vWF interaction and reacts only with unreduced SpIII-T4 fragment.

vWf purification and analysis of trypsin digest

vWf was purified from the patient's and normal plasma, using immunoaffinity chromatography on anti-vWf MoAb-239 as previously reported (23). Purified vWf was submitted to a trypsin treatment according to a previously published method (27) with some minor modifications : immunopurified vWf diluted in Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.35, was incubated at 37°C for 10 min with TPCK-treated trypsin (Worthington Biomedical Corp., Frechold, USA) and an enzyme to substrate ratio of 1:25 (w/w).

PCR amplification of genomic DNA :

All PCR amplifications were performed on genomic DNA extracted from peripheral blood leucocytes according to the method described by Miller et al. (28). Amplifications were performed using Taq polymerase (Amersham, England) in a reaction mixture containing 0.5 µg genomic DNA, 100 pmoles of each primer,

200 μ M of each deoxynucleotide triphosphate and the enzyme buffer (10x) provided by the manufacturer. Before addition of the enzyme (2 to 2.5 U/100 μ l reaction), the reaction mixture was heated at 94°C for 5 min to allow proper genomic DNA denaturation. Amplification cycles were subsequently carried out under standard conditions : 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 2 min. After 30 cycles, the PCR products were purified on Centricon 30 (Amicon Corp. Lexington, USA) to remove unincorporated primers and dNTPs.

Each set of primers was designed to allow amplification of introns sequences adjacent to the exon coding sequences.

Restriction endonuclease analysis :

PCR-amplified exon 18 fragments were digested with MaeII restriction endonuclease (Boehringer, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's conditions and separated on a 12 % polyacrylamide gel. After electrophoresis, the gel was stained with ethidium bromide for direct visualization under UV light.

PCR products direct sequencing :

Single-stranded DNA suitable for sequencing was obtained performing a second PCR amplification of 25 to 30 cycles on double-stranded PCR products as a template with only one of the two primers used in the first PCR reaction. Before sequencing, single-stranded products were purified on Centricon 100 or on DEAE cellulose paper during agarose gel electrophoresis (29) in order to remove double-stranded template and unincorporated primers and dNTPs. Sequencing was performed with a sequenase kit (USB, Cleveland, USA) using PCR primers and α ³⁵S dATP (Amersham, England) as a label. The samples were analyzed on a 6 % denaturing sequencing gel.

Results

vWf tryptic fragments analysis :

Fragments resulting from trypsin digestion of purified vWf were separated with SDS-PAGE (Fig.1). They displayed a different pattern in the patient compared to the control fragments. The smaller peptide characterized migrated faster than the corresponding 31 kDa peptide obtained with normal vWf, with an apparent molecular weight of approximately 29 kDa . However, under reducing conditions, no mobility shift was observed, the two peptides migrating with an apparent molecular weight of 34 kDa. Western blot analysis performed on both tryptic digests showed that MoAb-418, which recognizes normal unreduced 31 kDa peptide, was unable to recognize the patient's peptide. On the other hand both the patient's unreduced 29 kDa peptide, as well as normal 31 kDa peptide, were recognized by MaAbs-175-35A8 and 175-31H3 (data not shown).

DNA sequencing :

Direct sequencing of each PCR-amplified exons 18 to 24, covering the N-terminal region of mature vWf up to aa 311, was performed on both sense and antisense strands. DNA sequence analysis showed a single base mutation C to T in exon 18 at nucleotide 2372 (10). This T for C base replacement changes an ACG codon to an ATG codon and predicts the substitution of Threonine by Methionine at position 28 in the mature vWf. The patient was found to be homozygous for the substitution while her son was found to be heterozygous (Fig.2).

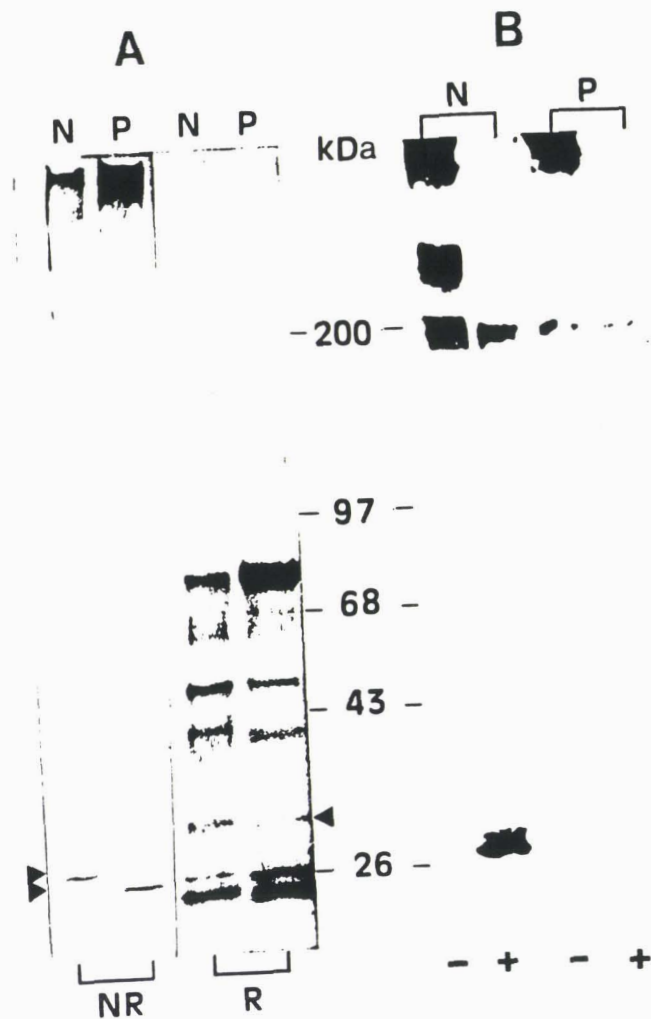


Fig. 1 : Analysis by SDS-PAGE (3.5 to 16 % gradient) of normal (N) and patient's (P) vWf. The molecular mass of marker proteins (in kDa) is indicated. A : Coomassie blue-stained gel run in either non reducing (NR) or reducing (R) conditions. All lanes correspond to limited trypsin digestion samples. The arrows indicate SpIII-T4 fragments identified separately with radiolabeled polyclonal anti-vWf antibodies (data not shown). B : Autoradiography of a gel run under non reducing conditions and transferred onto nitrocellulose before incubation with radiolabeled MoAb-418. Samples are analyzed either before (-) or after (+) limited trypsin digestion.⁶

Restriction endonuclease analysis

The mutation ACG → ATG destroyed a MaeII restriction site ACGT. PCR-amplified exon 18 fragments of the patient, her son, and the controls were digested to confirm the sequencing data and to search for this nucleotide substitution in normal individuals. The undigested pattern (one single band of 281 bp) found in the patient confirmed her homozygous state for the mutation. As her son exhibited both digested (113+168 bp) and undigested (281 bp) restriction fragments, he was confirmed as heterozygous. On the other hand, all the 28 control DNAs from normal individuals tested presented the homozygous digested pattern with two bands of 113 and 168 bp (Fig.3).

Discussion

As the vWf defect of the patient tentatively named "vWD Normandy" resulted from a specific FVIII binding alteration, as shown in our previous report (23), we decided to direct our investigations toward the vWf N-terminal region containing a major FVIII binding domain (12-14). More precisely, we focused on the tryptic fragment lying between aa 1 and 272 of mature vWf and able to inhibit FVIII binding to vWf (14), although another potential FVIII binding site has been reported in the C-terminal region of the vWf subunit but without precise localization (30). Comparison of normal and patient's vWf tryptic digests confirmed that a defect was indeed located in the N-terminal region of the vWf molecule, as revealed by the mobility shift observed on the patient's peptide, migrating in SDS-PAGE with an apparent lower molecular weight than normal. This mobility alteration could originate from a small deletion or from a point mutation in the vWf gene. Indeed, a single aa substitution may induce either charge modification creating a different SDS-peptide stoichiometry (31), the

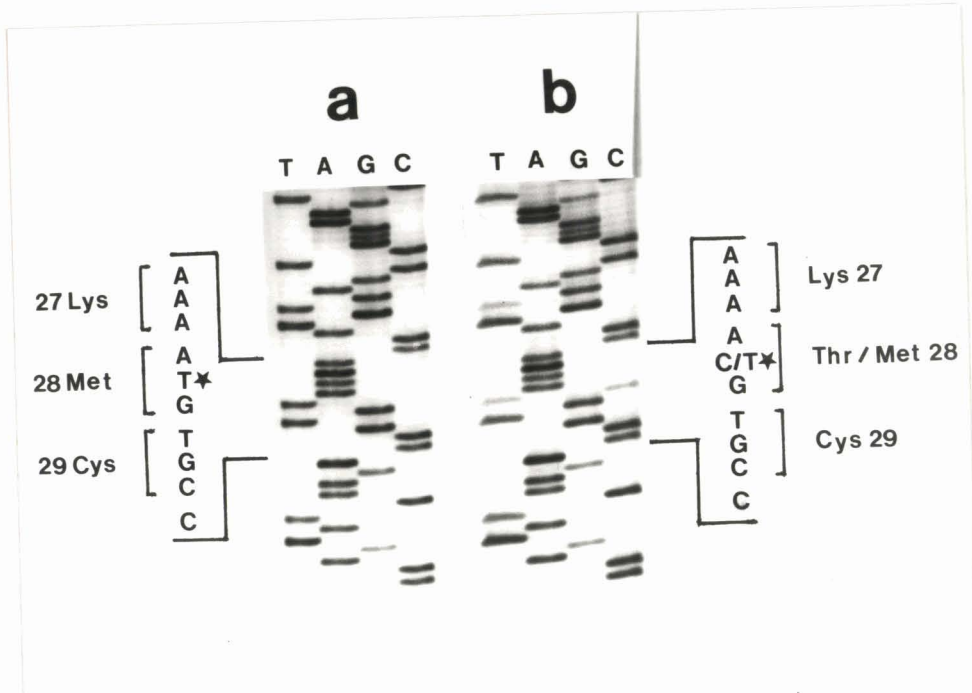


Fig. 2 : Part of the nucleotide sequence gels of amplified vWf exon 18 in the patient (a) and the patient's son (b). The asterisk indicates the point mutation ; the numbers indicate the position of corresponding amino acids in the mature protein.

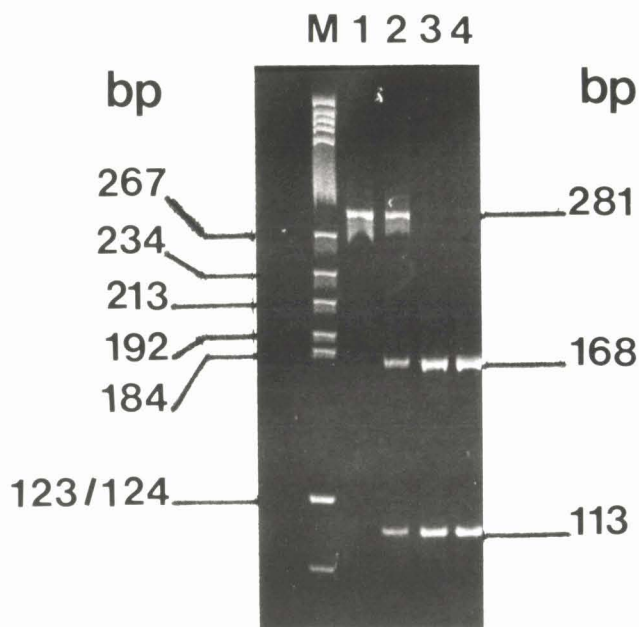


Fig. 3 : Pattern of the Mae II restriction digests of amplified vWf exon 18 run on a 12 % polyacrylamide gel. M = Molecular weight marker ; 1 : patient : undigested 281 bp fragment (the mutation destroys a Mae II restriction site) ; 2: patient's son with both digested and undigested fragments ; 3-4 : 2 normal individuals with digested fragments (two bands = 168 and 113 bp).

disappearance of a glycosylation site, or a conformational alteration of the vWf N-terminal peptide. However, the identical behavior of reduced normal and patient's tryptic peptides suggests that a conformational change is the most likely explanation for the change in electrophoretic mobility. This structure alteration hypothesis was further supported by our immunoblotting analysis since MoAb-418, a conformational MoAb unable to recognize normal reduced SpIII-T4, failed to detect the patient's unreduced corresponding peptide.

Having verified and more precisely localized the vWf region altered in vWD "Normandy", the molecular analysis of the 7 exons of vWf gene encoding the 311 N-terminal aa of mature vWf was undertaken. In the - 1.8 kb region sequenced, corresponding to exons 18 to 24, we found a single base mutation in exon 18, changing the Threonine at position 28 of mature vWf into a Methionine. This mutation, substituting codon ATG for ACG may result from a methylation-induced C to T transition at a CpG dinucleotide, well known for being mutational hotspots in mammals (32). The base substitution, destroying a Mae II ACGT restriction site, was conveniently confirmed by restriction digest analysis of PCR amplified exon 18. The patient was homozygous for this mutation and her son was heterozygous. In a previous paper (23), we discussed the possible mode of inheritance of this defect, which could be in theory either dominant, with only one gene affected in the patient and not transmitted in this case to her children, or recessive, with either double heterozygosity for one mutated allele and one silent allele, or homozygosity for a defective gene. The present genotypic data for the patient and her son confirm the hypothesis of a recessive gene abnormality which appeared the most likely in light of the consanguinity of the patient's parents.

The failure to find this mutation among normal individuals indicates that it is not a common (non-pathogenic) amino acid sequence polymorphism and suggests that the C to T transition is probably responsible for the FVIII-binding defect in this patient. It is worth noting that the altered aa 28 is localized on the 13 kDa polypeptide (aa 1 to 106) containing the epitope of MaAb-418 which totally inhibits FVIII binding to vWf (25), but not on the nonadecapeptide sequence (aa 78 to 96) shown to be the epitope of another anti-vWf MAb, MAb W5-6A also inhibiting FVIII/vWf interaction (33). Whether Thr²⁸ of vWf directly participates in the FVIII/vWf interaction, or its substitution by Met²⁸ alters the conformation of the N-terminal portion of mature vWF which seems to be crucial for FVIII/vWF interaction (33) is an open question. It would be particularly interesting to determine if this substitution of Met for Thr may induce a change in the secondary structure of this cysteine-rich region. The identification of the gene defect in other patients whose vWf fails to bind FVIII (7, 34) will be useful in providing an answer. Nevertheless, to prove that this mutation is responsible for the FVIII-binding defect characterized, the insertion of this mutation in an eukaryotic expression vector of vWf-cDNA is required. Studying the FVIII binding ability of the corresponding recombinant mutant vWf should help us to elucidate the origin of the FVIII binding deficiency observed in the "vWD Normandy" variants and provide valuable information on the vWf/FVIII interaction.

Acknowledgments :

We thank Dr J. Diéval from Compiègne Hospital for the blood samples. We are indebted to Dr E. Sadler (St Louis, Mo, USA) for providing partial vWf gene sequence (ref 10) before publication and for his advice. We thank Dr D. Meyer and Dr J.P. Girma (U143, Hopital Bicêtre) for the generous gift of MoAb-418. We are indebted to Dr H. Broly (Laboratoire Ingénierie Cellulaire, CRTS Lille) for preparing MoAbs-175-35A8 and 175-31H3. We thank Prof. M. Goudemand for his encouragement. We are grateful to D. Hoguet and V. Duretz for their excellent technical assistance. We thank V. Diéval for typing the manuscript.

- 1 - Hoyer LW : The factor VIII complex : structure and function. *Blood* 58:1,1981
- 2 - Owen W, Wagner R : Antihemophilic factor : separation of an active fragment following dissociation by salts or detergents. *Thromb Diath Haemorr* 27:502,1972
- 3 - Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW : Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on post transfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J Clin Invest* 60:390,1977
- 4 - Pavirani A, Meulien P, Harrer H, Schanber F, Dott K, Villeval D, Cordier Y, Wiesel ML, Mazurier C, Van de Pol H, Piquet Y, Cazenave JP, Lecocq JP : Choosing a host cell for active recombinant factor VIII production using vaccinia virus. *Biotechnology* 5:389,1987
- 5 - Kaufman RJ, Wasley LC, Dorner AJ : Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* 13:6352,1988
- 6 - Tuddenham EG, Lane RS, Rotblat F, Johnson AJ, Snape TJ, Middleton SM, Kernoff PB : Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease. *Br J Haematol* 52:259,1982
- 7 - Mazurier C, Gaucher C, Jorieux S, Parquet-Gernez A, Goudemand M : Evidence for a von Willebrand factor defect in factor VIII binding in three members of a family previously misdiagnosed mild haemophilia A and haemophilia A carriers. Consequences for therapy and genetic counselling. *Br J Haematol* 76:372,1990

- 8 - Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon DT, Bruns GA, Latt SA, Orkin SH : Human von Willebrand factor (vWF) : Isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localisation. *Science* 228:1401,1985
- 9 - Bonthron DT, Orkin SH : The human von Willebrand factor gene : Structure of the 5' region. *Eur J Biochem* 171:51,1988
- 10 - Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG, Sadler JE : Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 264:19514,1989
- 11 - Mazurier C : Purification, biochemistry and structure/fonction relationships of vWf, in Seghatchian MJ, Savidge GF (eds) : *Factor VIII-von Willebrand factor*, vol 1, Boca Raton, CRC Press, 1989,p41
- 12 - Takahashi Y, Kalafatis M, Girma JP, Sewerin K, Andersson LO, Meyer D : Localization of a factor VIII binding domain on a 34 kilodalton fragment of the N-terminal portion of von Willebrand factor. *Blood* 70:1679,1987
- 13 - Jorieux S, Magallon T, Mazurier C : Evidence that NH₂-terminal but not COOH-terminal moiety of plasma von Willebrand factor binds to factor VIII. *Thromb Res* 48:205,1987
- 14 - Foster PA, Fulcher CA, Marti T, Titani K, Zimmerman TS : A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. *J Biol Chem* 262:8443,1987
- 15 - Berkowitz SD, Ruggeri ZM, Zimmerman TS : Von Willebrand disease, in Zimmerman TS, Ruggeri ZM (eds) : *Coagulation and bleeding disorders. The role of factor VIII and von Willebrand factor*, New York, Marcel Dekker, 1989,p215
- 16 - Ruggeri ZM, Zimmerman TS : Von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* 70:895,1987

- 17 - Ngo KV, Glotz VT, Koziol JA, Lynch DC, Gitschier J, Ranieri P, Ciavarella N, Ruggeri ZM, Zimmerman TS : Homozygous and heterozygous deletions of the von Willebrand factor gene in patients and carriers of severe Willebrand disease. Proc Nat Acad Sci USA, 85: 2753,1988.
- 18 - Shelton-Inloes BB, Chehab FF, Mannucci PM, Federici AB, Sadler JE : Gene deletions correlate with the development of alloantibodies in von Willebrand disease. J Clin Invest 79:1459,1987
- 19 - Peake IR, Liddell MB, Moodie P, Standen G, Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Sorace JM, Sadler JE, Verweij CL, Bloom AL : Severe type III von Willebrand's disease caused by deletion of exon 42 of the von Willebrand factor gene : family studies that identify carriers of the condition and a compound heterozygous individual. Blood 75:654,1990
- 20 - Ginsburg D, Konkle BA, Gill JC, Montgomery RR, Bockenstedt P, Johnson TA, Yang AY : Molecular basis of human von Willebrand disease : analysis of platelet von Willebrand factor mRNA. Proc Nat Acad Sci USA 86:3723,1989
- 21 - Lyons S, Bruck ME, Bowie EJ, Montgomery RR, Gill JC, Yang AY, Ginsburg D : Molecular basis of type IIA von Willebrand disease. Proceedings of the Congress of the American Heart Association, Washington. 1989 (abst 193)
- 22 - Vink T, de Groot PG, Federici AB, Mannucci PM, Sixma JJ : The molecular defect in a von Willebrand disease type IIB patient. Thromb Haemost 62 :472,1989 (abst 1476)
- 23 - Mazurier C, Dieval J, Jorieux S, Delobel J, Goudemand M : A new von Willebrand factor defect in a patient with factor VIII deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWf. Characterization of abnormal vWf/FVIII interaction. Blood 75:20,1990

- 24 - Mejan O, Fert V, Delezay M, Delaage M, Cheballah R, Bourgois A : Immunopurification of human factor VIII/vWF complex from plasma. *Thromb Haemost* 59:364,1988
- 25 - Pietu G, Ribba AS, Meulien P, Meyer D : Localization within the 106 N-terminal amino acids of von Willebrand factor (vWF) of the epitope corresponding to a monoclonal antibody which inhibits vWF binding to factor VIII. *Biochem Biophys Res Commun* 163:618,1989
- 26 - Marti T, Rosselet SJ, Titani K, Walsh KA : Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* 26:8099,1987
- 27 - Houdijk WP, Girma J-P, Van Mourik JA, Sixma J, Meyer D : Comparison of tryptic fragments of von Willebrand factor involved in binding to thrombin-activated platelets with fragments involved in Ristocetin-induced binding and binding to collagen. *Thromb Haemost* 56:391,1986
- 28 - Miller SA, Dykes DD, Polesky HF : A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 16:215,1988
- 29 - Mack D, Kwon OS, Faloona F : Novel viruses, in Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) : PCR protocols. A guide to methods and applications, San diego, Academic Press, 1990, p378
- 30 - Koedam JA : "Interaction between factor VIII and von Willebrand factor" (Thesis) May 30th, 1989. University of Utrecht, Netherlands.
- 31 - Dejong WW, Zweers A, Cohen LH : Influence of single amino acids substitutions on electrophoretic mobility of sodium dodecyl sulfate-protein complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 82:532,1978
- 32 - Barker D, Schafer M, White R : Restriction sites containing CpG show a higher frequency of polymorphism in human DNA. *Cell* 36:131,1988

- 33 - Bahou WF, Ginsburg D, Sikkink R, Litwiller R, Fass DN : A monoclonal antibody to von Willebrand factor (vWF) inhibits factor VIII binding. Localization of its antigenic determinant to a nonadecapeptide at the amino terminus of the mature vWF polypeptide : J Clin Invest 84:56,1989
- 34 - Nishino M, Girma J-P, Rothschild C, Fressinaud E, Meyer D : New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. Blood 74:1591,1989

	B.G.	D.S.		P.C.		M.M.
exon 18	mutation Thr 28-->Met homozygote	N		N		N
exon 19	N	mutation Arg 53-->Trp homozygote		mutation Arg 53-->Trp hétérozygote		N
exon 20	N	N		mutation Arg 91-->Gln hétérozygote		mutation Arg 91-->Gln homozygote ?
exon 21	N	N		N		N
exon 22	N	N		N		N
exon 23	N	N		N		N
exon 24	N	N		N		N

Tableau 8 : résultats des séquençages des exons 18 à 24 chez les patients "Normandy".

N : séquence normale

	B.G.	D.S.		P.C.		M.M.
	allèle A homozygote	allèle G	allèle B	allèle A	allèle C	allèle D homozygote ?
polymor- phisme de l'intron 40	300 248 244	296 244 240	296 248 240	296 252 248	280 256 244	276 252 236
polymor- phisme de l'intron 19	-	-	-	-	+	+

Tableau 9 : polymorphismes des gènes du vWF chez les patients "Normandy"

(Les noms des allèles sont indépendants d'une famille à l'autre)

3 - Etude du patient D.S.

Dans cette famille d'origine Portugaise, deux soeurs de ce malade sont également atteintes (voir arbre généalogique page 104).

a - Données phénotypiques :

F VIII:C = 6,5 %

F VIII:Ag = 6 %

vWF:Ag = 88 %

b - Résultats :

Le séquençage de l'exon 19 a montré une mutation homozygote du nucléotide 2446, modifiant l'arginine n° 53 (CGG) en tryptophane (TGG) (Fig. 29, p. 137). Cette mutation, présente sur les deux gènes de ce patient, supprime un site de restriction Msp I. Cette particularité, schématisée ci-dessous, a permis l'étude de la ségrégation des chromosomes mutés dans la famille (Fig. 25, p. 105) dont l'arbre généalogique est représenté page 93.

Pour déterminer si cette mutation ne correspondait pas à un polymorphisme silencieux, l'exon 19 de l'ADN de 50 témoins a été amplifié et digéré par l'endonucléase de restriction Msp I. L'absence de mutation chez ces témoins suggère là encore que l'anomalie détectée pourrait être à l'origine de la maladie.

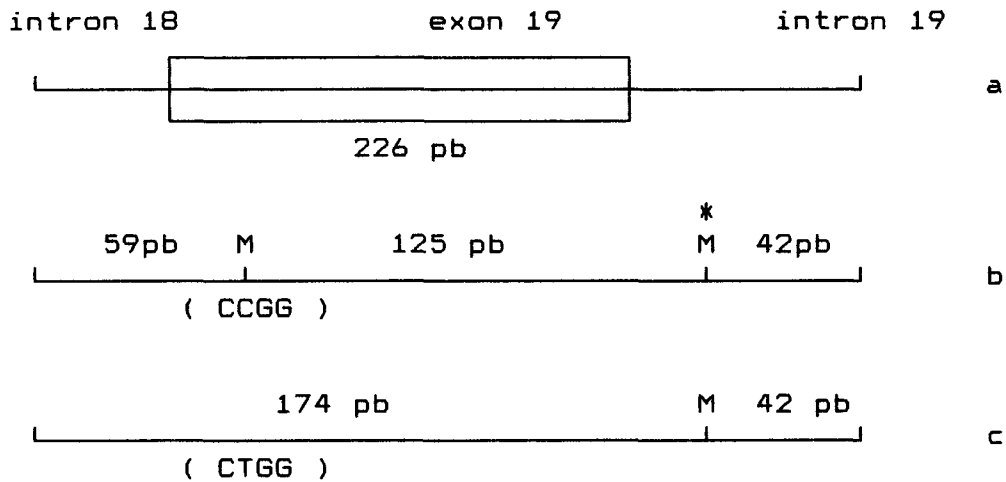


Fig. 29 : Schéma du fragment amplifié contenant l'exon 19
 a : fragment amplifié
 b : allele normal
 c : allele muté
 M : site de restriction Msp I

Ce patient est hétérozygote pour le polymorphisme de l'intron 40 (individu III-2, page 105) et présentent le même allèle pour le polymorphisme Msp I de l'intron 19 (Tableau 9, p. 135). Les deux chromosomes porteurs de la même mutation diffèrent donc pour le polymorphisme de type "VNTR" du gène du vWF. Aucune consanguinité n'a d'ailleurs été rapportée bien que leur père et leur mère soient originaires du même village du Portugal.

4 - Etude de la patiente P.C.

a - Données phénotypiques :

F VIII:C = 17 %

F VIII:Ag = 18 %

vWF:Ag = 98 %

b - Résultats :

Le séquençage de l'exon 19 chez cette malade a révélé sur l'un de ses gènes la mutation modifiant l'arginine n° 53 (CGG) en tryptophane (TGG), déjà identifiée chez le patient D.S. (page 136).

Dans l'exon 20 une seconde mutation ponctuelle au nucléotide 2561, modifiant l'arginine n° 91 (CGG) en glutamine (CAG), a été détectée sur l'un des gènes de cette patiente. Cette mutation supprimant un site de restriction Msp I (Fig. 30 p. 115), la transmission du chromosome morbide dans la famille de ce patient a pu être suivie. D'après cette étude (Fig. 24 p. 102) il apparait que les deux mutations identifiées ne sont pas localisées sur le même gène. En effet, la mutation située dans l'exon 19 provient de la mère de la patiente, cette dernière ayant hérité de son père la seconde mutation, située dans l'exon 20. La mère de la patiente, porteuse de la mutation déjà décrite dans la famille D., est elle aussi d'origine Portugaise. Cependant les trois gènes porteurs de la mutation Arg 53 ---> Trp dans l'exon 19 présentent lors de l'étude du polymorphisme de l'intron 40 des profils de restriction différents (Tableau 9 page 135).

Afin de déterminer si la mutation affectant l'AA n° 91 pouvait être aussi à l'origine de la maladie, l'exon 20 de 50 ADN témoins fût amplifié et digéré par l'endonucléase de restriction Msp I. Là encore l'absence d'altération chez les témoins analysés indique qu'il ne s'agit probablement pas d'un polymorphisme fréquent du gène du vWF.

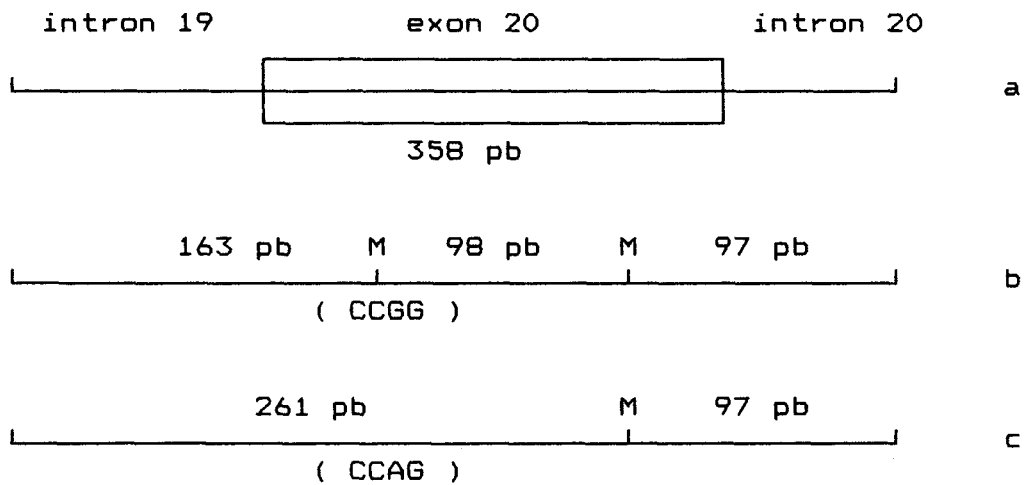


Fig. 30 : Schéma du fragment amplifié contenant l'exon 20
 a : fragment amplifié
 b : allele normal
 c : allele muté
 M : site de restriction Msp I

5 - Etude de la patiente M.M.

Il s'agit d'une patiente résidant près de Limoges, dont les échantillons de sang nous ont été confiés par le Dr Reynaud de l'hôpital de S^t Etienne. Des échantillons de sang des membres de la famille de cette malade ne sont pas encore, malheureusement, disponibles.

a - Données phénotypiques :

F VIII:C = 15 %

F VIII:Ag = 27,5 %

vWF:Ag = 55 %

b - Résultat :

Le séquençage de l'exon 20 a mis en évidence la mutation CGG ---> CAG modifiant l'arginine n° 91 en glutamine, déjà identifiée chez la patiente P.C. (Fig. 30

p. 139). Le polymorphisme de l'intron 40 et le polymorphisme de l'intron 19 sont tous deux à l'état homozygotes chez cette malade (Tableau 9, p. 135).

6 - Amplification à partir d'ARN

Deux amorces (la première située dans l'exon 19, la seconde dans l'exon 20) nous ont permis d'amplifier spécifiquement l'ARN du vWF du patient D.S.. Les amorces amplifient un fragment de 1729 pb sur l'ADN génomique (incluant l'intron 19) alors que le fragment amplifié à partir de l'ARN ne fait que 189 pb. La spécificité de ce fragment amplifié à partir d'ARN a été confirmée par séquençage.

7 - Discussion

L'analyse directe du vWF de la patiente B.G. a montré que la mobilité électrophorétique du fragment tryptique correspondant aux 272 premiers acides aminés du vWF mature était modifiée en milieu non réducteur et normale en milieu réduit (67). Cette particularité de migration indiquait à priori que l'altération devait résulter d'une mutation ponctuelle affectant la conformation de ce fragment plutôt que d'une délétion. Le séquençage des 7 exons codant pour les 314 premiers acides aminés de la sous-unité du vWF mature a confirmé cette hypothèse et nous a permis de déceler une mutation ponctuelle changeant l'acide aminé n° 28 sur l'ADN de la patiente B.G.. Le fait qu'à la fois deux polymorphismes du

gène du vWF (intron 40 et intron 19) et que la mutation identifiée soient homozygotes montre que cette patiente, dont les parents sont cousins au troisième degré, a hérité très probablement du même gène anormal de sa mère et de son père.

Afin de vérifier si cette mutation était bien responsable du défaut de fixation du FVIII sur le vWF, celle-ci a été introduite par mutagenèse dirigée sur l'ADN complémentaire du vWF. Cet ADN complémentaire a ensuite été exprimé dans des cellules de type COS (où l'expression est de type transitoire) et CHO (où l'expression est permanente) afin de produire un facteur Willebrand recombinant portant cette mutation. Ces travaux ont été réalisés dans le laboratoire du Dr Sadler à l'institut Howard Hughes de Saint Louis, USA. L'analyse fonctionnelle dans notre laboratoire, de ce vWF recombinant muté montre que celui-ci ne fixe pas le FVIII, contrairement au vWF recombinant témoin produit à partir d'ADN complémentaire normal. Les valeurs de FVIII fixé exprimées par rapport aux quantités de vWF sont identiques pour le vWF recombinant muté et le vWF plasmatique de la patiente B.G.. Ces résultats démontrent que la mutation de la Thr n° 28 en Met est donc bien responsable de l'absence de fixation du FVIII sur le vWF chez cette malade.

La mutation de l'Arg n° 53 en Trp a été identifiée dans deux familles apparemment non apparentées (D et P). Les études des polymorphismes du gène du vWF ont montré que dans la famille D la mutation C ---> T est

présente sur deux gènes apparemment différents. Dans la famille P la patiente est hétérozygote : un des chromosomes porte la mutation de l'acide aminé n° 53 alors que le second porte la mutation à l'origine du changement de l'acide aminé n° 91.

Les trois chromosomes portant la mutation de l'acide aminé n° 53, ne présentent pas le même profil de restriction lors de l'étude du polymorphisme de l'intron 40 du gène du vWF. On devrait donc en conclure que ces trois chromosomes ne sont pas identiques. Néanmoins, du fait de l'origine commune de ces trois individus, originaires du Nord du Portugal, on doit se demander si cette mutation s'est produite sur trois gènes différents ou, au contraire, sur un seul gène. Dans ce dernier cas, les trois allèles de la séquence VNTR de l'intron 40 (B, G, A) dériveraient d'un même gène ancestral sur lequel se serait produite la mutation "Normandy". En l'absence d'une étude généalogique complète il nous est impossible de vérifier cette hypothèse. De plus cet ancêtre commun est peut être, et même probablement, situé plusieurs générations en amont de nos patients. En effet notre étude de deux ou trois générations dans plus de 40 familles ne montre aucun phénomène de recombinaison dans le RFLP de l'intron 40. Si ces trois gènes dérivent d'un gène ancestral commun, cela implique qu'une recombinaison a eu lieu dans la région VNTR de l'intron 40 : cette hypothèse est tout à fait probable car les allèles A et G ne diffèrent de l'allèle B que par la taille de l'un des trois fragments de restriction (respectivement 248 et 240 pb). Ainsi, à partir de l'allèle

B, une recombinaison modifiant le fragment de 248 pb en 244 pb (perte d'une répétition ATCT) pourrait être à l'origine de l'allèle G, tandis qu'une insertion de trois répétitions ATCT dans le fragment de 240 pb, transformé en 252 pb pourrait donner l'allèle A (voir ci-dessous).

allèles portant la mutation de l'acide aminé n° 53		
296	296	296
248	244	252
240	240	248
= B	= G	= A

La mutation G ---> A à l'origine de la substitution de l'Arg n° 91 en Gln a été mise en évidence chez les deux patientes P.C. et M.M.. Chez cette dernière, la mutation et les polymorphismes de l'intron 40 et de l'intron 19 du gène du facteur Willebrand apparaissent à l'état homozygote. Ne disposant pas d'échantillon de sang du père, du frère et de la fille de cette malade et n'ayant pas connaissance de son ascendance, nous n'avons pas pu déterminer si cette mutation est effectivement homozygote ou si une délétion est présente sur le deuxième gène de cette patiente. Dans le cas supposé d'un gène délété, la délétion devrait s'étendre au moins de l'intron 19 à l'intron 40 (soit 54 000 pb au minimum) puisque ces polymorphismes sont tous les deux détectés à l'état homozygote chez cette malade.

allèles portant la mutation de l'acide aminé n° 91	
280	276
256	252
244	236
= C	= D

La question d'une origine commune se pose également en ce qui concerne les deux chromosomes porteurs de la mutation affectant l'acide aminé n° 91 dans les familles P. et M. Dérivent-ils d'un ancêtre commun ou, au contraire, résultent-ils de deux mutations identiques mais indépendantes ? L'hypothèse d'un ancêtre commun semble ici beaucoup moins vraisemblable car il faudrait trois phénomènes de recombinaison sur le même allèle pour modifier les trois fragments de digestion qui diffèrent entre l'allèle C et l'allèle D.

Les trois mutations identifiées à ce jour sur les 4 variants "Normandy" analysés sont situées sur un site "à haut risque" de mutation. Elles affectent en effet des dinucléotides CG dont le taux de mutation est supérieur de près de 30 % au risque théorique (150). Elles sont toutes les trois situées dans la séquence spécifique d'une endonucléase de restriction (Mae II pour la mutation de l'acide aminé n° 28, Msp I pour les deux autres), ce qui nous a permis de suivre la transmission de ces chromosomes morbides dans les familles de ces patients et de vérifier qu'il ne s'agissait pas d'un polymorphisme courant présent

dans une population témoin. Ces mutations entraînent toutes un changement d'acide aminé situé dans le fragment N-terminal de 272 acides aminés comprenant le site majeur de fixation du FVIII. L'expression d'un facteur Willebrand recombinant muté a d'ailleurs démontré que la mutation de l'acide aminé n° 28 est bien responsable de l'absence de fixation du facteur VIII chez le premier patient "Normandy" décrit dans notre laboratoire. Une étude similaire des deux autres mutations par mutagenèse dirigée et expression est actuellement en cours.

Le ou les mécanismes par lesquels ces substitutions empêchent la fixation du FVIII ne sont pas encore connus. Un modèle de structure secondaire de la région correspondant aux 272 premiers acides aminés de la molécule a été proposé (88). Dans ce modèle les 7 pont-disulfure qui ont été localisés sont positionnés et permettent de schématiser certains repliements de la molécule (Fig. 31, p. 146). On constate d'après cette figure que les trois mutations identifiées pourraient être situées au niveau de zones présumées de repliement. Cette observation permet d'avancer les hypothèses suivantes : les 3 changements d'acides aminés identifiés pourraient agir :

- soit directement, les acides aminés modifiés étant impliqués dans la liaison avec le FVIII. Il est en effet possible qu'un repliement de la molécule forme un site fonctionnel qui comprendrait les acides aminés n° 28, 53 et 93. Si cette hypothèse s'avérait exacte, elle pourrait expliquer que la mutation de trois acides aminés différents et relativement éloignés au niveau de la

structure primaire entraine le même phénotype chez les patients concernés.

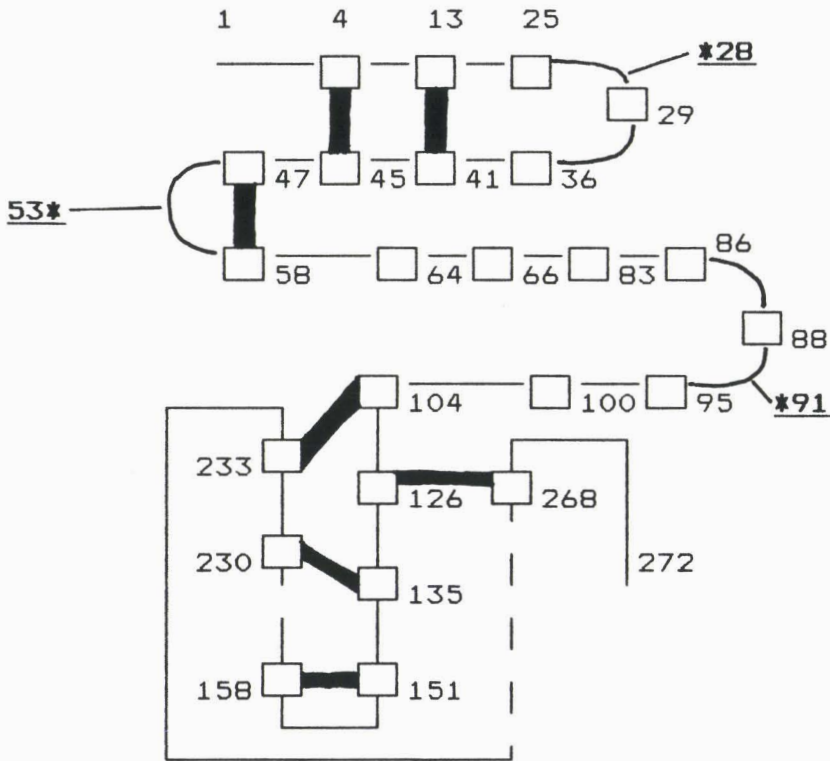


Fig. 31 : position des ponts disulfures dans le fragment correspondant aux 272 acides aminés N-terminaux de la sous unité mature du vWF, selon Marti(88). Les chiffres correspondent au numéro de l'acide aminé

- : cystéine (engagée dans un pont disulfure non encore décrit)
- : pont disulfure
- * : mutations identifiées (acides aminés n° 28, 53 et 91)

- soit indirectement, en empêchant la formation de ponts disulfure, ce qui modifierait la structure secondaire normale indispensable à la liaison avec le FVIII. Dans le cas de la mutation de l'acide aminé n° 53,

la seconde hypothèse semble possible car cet acide aminé est, selon le modèle proposé, situé à proximité d'un pont disulfure qui semble crucial pour le repliement.

Les résultats de biologie moléculaire obtenus à ce jour ne nous permettent pas de vérifier l'une ou l'autre de ces hypothèses. Il faudrait étudier directement la protéine, par exemple en réalisant des modifications chimiques de certains acides aminés afin d'étudier soit leur appartenance ou non au site actif, soit leur implication éventuelle dans la structure secondaire responsable de la formation de ce site actif. Une autre approche consisterait à changer un acide aminé par mutagenèse dirigée et à étudier l'influence de cette modification.

L'amplification spécifique de l'ARN du vWF que nous avons montrée, réalisable à partir de 100 ml de sang, devrait faciliter par la suite l'étude d'autres variants. En effet, à partir de l'ARN il sera possible de n'étudier que la séquence codante, celle-ci faisant environ 8,4 kb (alors que le gène du vWF fait environ 178 kb).

CONCLUSION

CONCLUSIONS

Depuis de nombreuses années, le laboratoire de Recherche sur l'Hémostase du C.R.T.S. de Lille a orienté ses travaux vers l'étude du facteur Willebrand. L'objectif de la création en 1988 d'un laboratoire complémentaire spécialisé en biologie moléculaire était double: D'une part caractériser les anomalies génétiques responsables de cette maladie chez les divers types de patients Willebrand et compléter, par une autre approche, les études des relations structure-fonctions du facteur Willebrand. D'autre part, mettre en oeuvre des techniques d'études des polymorphismes des gènes des facteurs VIII et IX afin de pouvoir proposer un dépistage de conductrices d'hémophilies et éventuellement un diagnostic anténatal aux familles d'hémophiles de la région.

Notre première tâche a donc consisté à adapter la technique de P.C.R. aux études familiales, puis à la détection d'anomalies génétiques chez des hémophiles A et B. Cette approche nous a permis, par la suite, en étendant notre étude à la maladie de Willebrand, de mettre en évidence un nouveau polymorphisme bi-allélique et de caractériser un polymorphisme multi-allélique dans

le gène du vWF. Ce dernier polymorphisme s'est avéré très utile dans nos études familiales de différents types de la maladie de Willebrand. L'étude précise du polymorphisme de l'intron 40 que nous avons réalisée montre que cette région de type VNTR est la plus variable actuellement caractérisée sur le gène du vWF. La grande informativité de ce polymorphisme quand il est étudié par la méthode d'analyse mise au point le rend intéressant non seulement pour les études familiales et le diagnostic anténatal, mais aussi pour d'autres applications éventuelles : tests de paternité, médecine légale, détection de contamination.

Nos résultats ont montré que les études familiales des trois maladies hémorragiques les plus fréquentes peuvent maintenant être réalisées le plus souvent par P.C.R.. En effet, tant pour la maladie de Willebrand que pour l'hémophilie B, il n'est plus nécessaire de réaliser des études par "Southern blot". Par contre, cette technique est toujours nécessaire pour les études familiales d'hémophiles A. Le principal intérêt de l'analyse des polymorphismes par P.C.R. est qu'elle permet de rendre un résultat en moins de 48 h alors que, par la technique de Southern, 7 à 8 jours, au moins, sont nécessaires. De plus, grâce à la méthode d'amplification sans purification préalable de l'ADN que nous avons mise au point, un résultat peut être rendu dans la journée.

En outre, l'étude des gènes du FVIII et du FIX d'hémophiles A et B par P.C.R. nous a permis de localiser les anomalies génétiques responsables de la maladie chez trois patients (1 hémophile A et 2 hémophiles B) en nous fondant uniquement sur l'amplification ou non de fragments comprenant certains des exons. L'étude systématique par P.C.R. suivie d'une digestion par des endonucléases de restriction et/ou analyse par électrophorèse en gel de gradient dénaturant devrait permettre de caractériser par la suite les anomalies responsables des hémophilies chez un plus grand nombre de patients.

La deuxième partie de notre travail a eu pour but de caractériser l'anomalie génétique responsable d'un nouveau variant de la maladie de Willebrand, appelé "Normandy" découvert au laboratoire de Recherche sur l'Hémostase du C.R.T.S. de Lille.

La caractérisation par séquençage de 3 mutations vraisemblablement responsables du déficit en FVIII chez 4 patients ayant le même phénotype "Normandy" a confirmé l'importance de la région N terminale de la forme mature du vWF pour la fixation du facteur VIII, et particulièrement des 3 acides aminés caractérisés. Bien que ces trois mutations soient localisées dans la même région, leur mécanisme d'action est peut-être différent. Des études complémentaires, notamment par des techniques de mutagenèse dirigée, devraient permettre dans l'avenir de mieux connaître le mécanisme d'interaction entre le

facteur VIII et le facteur Willebrand qui apparaît si importante dans la coagulation.

Ainsi l'ensemble de nos résultats montrent que la technique d'amplification (P.C.R.), que nous avons introduite et appliquée au cours de ce travail de thèse, se révèle une technique très performante tant dans les études familiales que dans la caractérisation des anomalies responsables de certaines maladies hémorragiques héréditaires.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1 AHRENS P, KRUSE TA, SCHWARTZ M, RASMUSSEN PB, DIN N. A new Hind III restriction fragment length polymorphism in the hemophilia A locus. Human. Genet., 1987, 76, 127-128.
- 2 ANTONARAKIS SE, KAZAZIAN HH. The molecular basis of hemophilia A in man. Trends Genet., 1988, 4, 233-237.
- 3 ANTONARAKIS SE, WABER PG, KITTUR SD, PATEL AS, KAZAZIAN HH, MELLIS MA, COUNTS RB, STAMATOYANNOPOULOS G, BOWIE EJW, FASS DN, PITTMAN DD, WOZNEY JM, TOOLE JJ. Hemophilia A. Detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. New Engl. J. Med., 1985, 313, 842.
- 4 ARAI M, INABA H, HIGUCHI M et al. Direct characterization of factor VIII in plasma : detection of a mutation altering a thrombin cleavage site (Arg 372 ---> His). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 4277-4281.
- 4b ASSOULINE Z, KERBIRIOU-NABIAS DM, PIETU G, THOMAS N, BAHNAK BR, MEYER D. The human gene for von Willebrand factor. Identification of repetitive Alu sequences 5' to the transcription initiation site. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1988, 153, 1159-1166.
- 5 ATTREE O, VIDAUD D, VIDAUS M et al. Mutations in the catalytic domain of human coagulation factor IX : rapid characterization by direct genomic sequencing of DNA fragments displaying an altered melting behavior. Genomics, 1989, 4, 266-272.
- 5b BAHOU WF, GINSBURG D, SIKKINK R, LITWILLER R, FASS DN. A monoclonal antibody to von Willebrand factor (vWF) inhibits factor VIII binding. Localization of its antigenic determinant to a nonadecapeptide at the amino terminus of the mature vWF polypeptide. J. Clin. Invest., 1989, 84, 56.
- 6 BARKER D, SCHAFER M and WHITE R. Cell, 1984, 36, 131-138.
- 7 BARDONI B, SAMPIETRO M, ROMANO M, CRAPANZANO C, MANNUCCI PM, CAMERINO G. Characterization of a partial deletion of the factor VII gene in a haemophiliac with inhibitor. Hum. Genet., 1988, 79, 86.
- 8 BERG LP, WIELAND K, MILLAR DS, SCHLOSSER M, WAGNER M., KAKKAR VV, REISS J, COOPER DN. Detection of a novel point mutation causing haemophilia A by PCR/direct sequencing of ectopically-transcribed factor VIII mRNA. Hum. Genet., 1990, 85, 655-658.

- 9 BERNARDI F, DELSENNO L, BARBIERI R et al. Gene deletion in an Italian haemophilia B subject. J. Med. Genet., 1985, 22, 305-307.
- 10 BERNARDI F, VOLINIA S, PATRACCHINI P, GEMMATI D, BONINSEGNIA S, SCHWIENBACHER C, MARCHETTI G. A recurrent missense mutation (Arg ---> Glu) and a partial deletion in factor VIII gene causing severe hemophilia A. Br. J. of Haematol., 1989, 71, 271.
- 11 BERNARDI F, MARCHETTI G, BERTAGNOLO V, FAGGIOLI L, DEL SENCO L. Two Taq I RFLPs in the human von Willebrand factor gene. Nucleic Acids Res., 1987, 15, 1347.
- 12 BOMTEMPO FA, LEWIS JH, GORENC TJ, SPERO JA, RAGNI MW, SCOTT JP, STARZL TE. Liver transplantation in hemophilia A. Blood, 1987, 69, 1721.
- 12b BROWN WT, WU Y, GROSS AC, CHAN CB, DOBKIN CS, JENKINS EC. RFLP for linkage analysis of the fragile X syndrome. Lancet, 1987, I, 280.
- 13 BURKE RL, PACHL C, QUIROGA M, ROSENBERG S, HAIGWOOD N, NORDFANG O, EZBAN M. The functional domains of coagulation factor VIII:C. J. Biol. Chem., 1986, 261, 12574.
- 14 CAMERINO G, OBERLE I, DRAYNA D, MANDEL JL. A new Msp I restriction fragment length polymorphism in the hemophilia B locus. Hum. Genet., 1985, 71, 79-81.
- 15 CASARINO L, PECORARA M, MORI PG, MORFINI M, MANCUSO G, SCRIVANO L, MOLINARI AC, LANZA T, GIAVARELLA G, LOI A, PERSEU L, CAO A, PIRASTU M. Molecular basis for hemophilia A in Italiens. Res. Clin. Lab., 1986, 16, 227.
- 16 CASÙLA L, MURRU S, PECORARA M, RISTALDI MS, RESTAGNO G, MANCUSO G, MORFINI M, De BIASI R, BAUDO F, CARBONARA A, MORI PG, CAO A, PIRASTU M. Recurrent mutations and three novel rearrangements in the factor VIII gene of hemophilia A patients of Italiens descent. Blood, 1990, 75, 662-670.
- 17 CHEN SH, SCOTT CR, SCHOOF J, LOVRIEN EW, KURACHI K. Factor IX Portland : a nonsense mutation (CGA to TGA) resulting in hemophilia B. Am. J. Hum. Genet., 1989, 44, 567-569.
- 18 CHEN SH, YOSHITAKE S, CHANCE PF et al. An intragenic deletion of the factor IX gene in a family with hemophilia B. J. Clin. Invest., 1985, 73, 2161-2164.
- 19 CHIEN A, EDGAR DB, TRELA JM.- Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile "Thermus aquaticus". J. Bacteriol., 1976, 127, 1550-1557.
- 20 COOPER DN and KRAWCZAK M. Hum. Genet., 1989, 83, 181-188.

- 21 CUTTING GR, ANTONARAKIS SE, YOUSSEOUFIAN H, KAZAZIAN HH. Accuracy and limitations of pulsed field electrophoresis in sizing partial deletions of the factor VIII gene. Mol. Biol. Med., 1988, 5, 173-184.
- 22 DENTON PH, FOWLKES DM, LORD ST, REISNER HM. Hemophilia B Durham : a mutation in the first EGF-like domain of factor IX that is characterized by polymerase chain reaction. Blood, 1988, 72, 1407- 1411.
- 23 DIN N, SCHWARTZ M, KRUSE T, VESTEGAARD SR, AHRENS P, SCHEIBEL E, NORDFANG O, EZBAN M. Factor VIII gene-specific probes used to study heritage and molecular defects in hemophilia A. Res. Clin. Lab., 1986, 16, 182.
- 24 DRISCOLL MC, BOUHASSIRA E, ALEDORT LM. A codon 338 nonsense mutation in the factor IX gene in unrelated hemophilia B patients : factor IX 338 New York. Blood, 1989, 74, 737-742.
- 25 DRISCOLL CM, CHIU C, HILGARTNER MW. A Kpn I DNA polymorphism in the human von Willebrand factor (vWF) gene. Nucleic Acids Res., 1990, 18, 4959.
- 26 DRISCOLL MC, DISPENZIERI A, TOBIAS E, MILLER CH, ALEDORT LM. A second Bam HI DNA polymorphism and haplotype association in the factor IX gene. Blood, 1988, 72, 61-65.
- 27 DROPCHO EJ, CHEN YT, POSNER JB, LLOYD JO. Cloning of a brain protein identified by autoantibodies from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 4452-4456.
- 28 EATON D, RODRIGUEZ H, VEVAR GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages of thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. Biochemistry, 1986, 25, 505.
- 29 EATON DL, WOOD WI, EATON D, HASS PE, HOLLINGSHEAD P, WION K, MATHER J, LAWN RM, VEVAR GA, GORMAN C. Construction and characterization of an active factor VIII variant lacking the central one-third of the molecule. Biochemistry, 1986, 25, 8343.
- 30 EWERHARDT B, LIDWIG M, SCHWAAB R, SCHNEPPENHEIM R, OLEK K. An Eco RI polymorphism in the human von Willebrand factor (vWF) gene. Nucleic Acids Res., 1989, 17, 5416.
- 31 FAY P, ANDERSON MT, CHAVIN SL, MARDER VJ. The size of human factor VIII heterodimers and the effects produced by thrombin. Biochim. Biochem. Acta., 1986, 871, 268.

- 32 FOSTER PA, FULCHER CA, HOUGHTEN RA, ZIMMERMAN TS. An immunogenic region within residues Val 1670 - Glu 1684 of factor VIII light chain induces antibodies which inhibit binding of factor VIII to von Willebrand factor. J. Biol. Chem., 1988, 263, 5230.
- 33 FOSTER PA, FULCHER CA, MARTI T, TITANI K, ZIMMERMAN TS. A major factor VIII binding domain resides within the amino terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. J. Biol. Chem., 1987, 262, 8443.
- 34 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., 1987, 58, 76.
- 35 FOWLER WE, FRETTO LJ, HAMILTON KK, ERICKSON HP, Mc KEE PA. Substructure of human von Willebrand factor. J. Clin. Invest., 1985, 76, 1491-1500.
- 36 FREEDENBERG DL, CHEN SH, KURACHI K, SCOTT R. Msp I polymorphic site within the factor IX gene. Hum. Genet., 1987, 76, 262-264.
- 37 FURIE B, FURIE BC. Molecular basis of hemophilia. Seminars in hematology, 1990, 27, 270-285.
- 38 FURIE B, FURIE BC. Molecular basis of blood coagulation. Cell, 1988, 53, 505-518.
- 38b GEEDES VA, LE BONNIEC BF, LOUIE GV et al. Gene deletion in patient with hemophilia B is caused by a novel mutation in the protease domain of factor IX Vancouver. J. Biol. Chem., 1989, 264, 4689-4697.
- 39 GIANNELLI F, CHOO KH, WINSHIP PR. Characterisation and use of an intragenic polymorphic marker for detection of hemophilia B (factor IX deficiency). Lancet, 1984, 1, 239-241.
- 40 GIANNELLI F, CHOO KH, REES DJG, BOYD Y, RIZZA CR, BROWNLEE G.G. Gene deletions in patients with haemophilia B and anti-factor IX antibodies. Nature, 1983, 303, 181-182.
- 41 GIANNELLI F, GREEN PM, HIGH KA, LOZIER JN, LILLICRAP DP, LUDWIG M, OLEK K, REITSMA PH, GOOSENS M, YOSHIOKA A, SOMMER S., BROWNLEE GG. Haemophilia B : database of point mutations and short additions and deletions. Nucleic Acid Res., 1990, 18, 4053-4059.
- 42 GIBAS A, DIENSTAG JL, SCAFER AL, DELMONICO F, BYNUM TE, SCHOOLEY R, RUBIN RH, COSIMI AB. Cure of hemophilia A orthotopic liver transplantation. Gastroenterology, 1988, 95, 192.

- 43 GINSBURG D, KONKLE BA, GILL JC, MONTGOMERY RR, BOCKENSTEDT PL, JOHNSON TA, YANG AY. Molecular basis of human von Willebrand disease : analysis of platelet von Willebrand factor mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 3723-3727.
- 44 GINSBURG D, HANDIN RI, BONTHRON DT, DONLON TA, BRUNS GAP, LATT SA, ORKIN SH. Human von Willebrand factor (vWF) : isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. Science, 1985, 228, 1401.
- 45 GITSCHIER J, WOOD WI, GORALKA TM, WION KL, CHEN EY, EATON DH, VEHAR GA, CAPON DJ, LAWN RM. Characterization of the human factor VIII gene. Nature, 1984, 312, 326.
- 46 GITSCHIER J, DRAYNA D, TUDDENHAM EGD, WHITE RL, LAWN RM. Genetic mapping and diagnosis of hemophilia A achieved through a Bcl I polymorphism in the factor VIII gene. Nature, 1985, 314, 738-740.
- 47 GITSCHIER J, WOOD WI, SHUMAN MA et al. Identification of a missense mutation in the factor VIII gene of a mild haemophiliac. Science, 1986, 232, 1415-1416.
- 48 GITSCHIER J, KOGAN S, LEVINSON B, TUDDENHAM EGD. Blood, 1988, 72, 1022-1028.
- 49 GITSCHIER J. Am. J. Hum. Genet., 1988, 43, 274-279.
- 50 GREEN PM, BENTLEY DR, MIBASHAN RS, NILSON IM, GIANNELLI F. Molecular pathology of haemophilia B. EMBO. J., 1989, 8, 1067-1072.
- 51 GRAHAM JB, KUNKEL GR, TENNYSON GS, LORD ST, FOWLKES DM. The Malmo polymorphism of factor IX : establishing the genotypes by rapid analysis of DNA. Blood, 1989, 73, 2104-2107.
- 52 GYLLENSTEN UB, ERLICH A.- Generation of single-strand DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA DQA locus. Proc. Natl. Acad. Sci., 1988, 85, 7652-7656.
- 52B HANAUER A, De La SALLE C. Direct detection of the deletion-insertion polymorphism of the factor IX gene by analysis of amplified DNA sequences (PCR). Thrombosis Research, 1990, 59, 219-220.
- 53 HASSAN HJ, LEONARDI A, GUERRIERO R et al. Hemophilia B with inhibitor : molecular analysis of the subtotal deletion of the factor IX gene. Blood, 1985, 66, 728-730.
- 54 HARPER K, WINTER RM, PEMBREY ME, HARTLEY D, DAVIES KE, TUDDENHAM EGD. A clinically useful DNA probe closely linked to hemophilia A. Lancet, 1984, 2, 6.

- 55 HAY CW, ROBERTSON KA, YONG SL et al. Use of a Bam HI polymorphism in the factor IX gene for the determination of hemophilia B carrier status. Blood, 1984, 12, 8861-8872.
- 56 HIGUCHI M, KOCHHAN N and OLEK K. A somatic mosaic for haemophilia detected at the DNA level. Mol. Biol. Med., 1988, 5, 23-27.
- 57 HIGUCHI M, KOCHHAN N, SCHWAAB R, EGLI H, BRACKMAN HH, HORST J, OLEK K. Molecular defects in hemophilia A : identification and characterisation of mutations in factor VIII gene and family analysis. Blood, 1989, 74, 1045-4051.
- 58 HOYER LW, TRABOLD NC. The effect of thrombin on human factor VIII. Cleavage of the factor VIII procoagulant protein during activation. J. Lab. Clin. Med., 1981, 97, 50.
- 59 IANNUZZI MC, KONKLE BA, GINSBURG D, COLLINS FS. Rsa I RFLP in the von Willebrand factor gene. Nucleic Acids Res., 1987, 15, 5909.
- 60 INABA H, FUJIMAKI M, KAZAZIAN HH et al. Mild hemophilia A resulting from Arg to Leu substitution in exon 26 of factor VIII gene. Hum. Genet., 1989, 81, 335-338.
- 61 INBAL A, HANDIN RI. Two Taq I polymorphisms in the 5' region of the von Willebrand factor (vWF) gene. Nucleic Acids Res., 1989, 17, 10143.
- 62 INBAL A, HANDIN R. Stu I polymorphisms in the vWF gene. Nucleic Acid Res., 1990, 18, 4960.
- 63 INNIS MA, GELFAND DH. Optimization of PCRs. PCR protocols, 3-12, (ed Innis M.A.), 1990, Academic Press.
- 64 INNIS MA, MYAMBO KB, GELFAND DH, BROW MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 1988, 85, 9436-9440.
- 65 JAFFE EA, HOYER LW, NACHAM RL. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. Proc. Nat. Acad. Sci., US-Biol Sci, 1974, 71, 1966-1969.
- 66 JEFFREYS AJ, WILSON V and THEIN SL. Nature, 1985, 314, 67-73.
- 67 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., 1987, 48, 205.
- 68 KAPLAN JC et DELPECH M. Biologie moléculaire et médecine. Med/Sci, Flammarion, 1989.

- 68b KIDD KK, BOWCOCK AM, PEARSON PL, SCHMIDTKE J, WILLARD HF, TRACK RK, RICCIUTU F. Report of the committee on human gene mapping by recombinant DNA techniques. Cytogenet. Cell Genet. (Update to the 9th International Workshop on Human gene mapping), 1988, 49, 132-138.
- 69 KOEBERL DD, BOTTEMA CDK, KETTERLING RP, BRIDGE PJ, LILLICRAP DP, SOMMER SS. Mutations causing hemophilia B : direct estimate of the underlying rates of spontaneous germ-line transitions, transversions, and deletions in a human gene. Am. J. Hum. Genet., 1990, 47, 202-217.
- 70 KOEBERL DD, BOTTEMA CDK, SARKAR G, KETTERLING RP, CHEN SH, SOMMER SS. Recurrent nonsense mutations at arginine residues cause severe hemophilia B in unrelated hemophiliacs. Hum. Genet., 1990, 84, 387-390.
- 70B KOEDAM JA : "Interaction between factor VIII and von Willebrand factor" (Thesis) May 30, 1989, University of Utrecht, Netherlands.
- 71 KOGAN SC, DOHERTY M, GITSCHIER J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences : application to hemophilia A. N. Engl. J. Med., 1987, 317, 985.
- 72 KONKLE BA, KIM S, IANNUZZI MC, ALANI R, COLLINS FS, GINSBURG D. Sac I RFLP in the human von Willebrand gene. Nucleic Acids Res., 1987, 15, 6766.
- 73 KUNKEL GR, GRAHAM JB, FOWLKES DM, LORD ST. Rsa I polymorphism in von Willebrand factor (vWF) at codon 789. Nucleic Acids Res., 1990, 18, 4961.
- 74 LAVERGNE JM, BAHNAK BR, VERWEIJ CL, PANNEKOEK H, MEYER D. A second Xba I polymorphic site within the human von Willebrand factor (vWF) gene. Nucleic Acids Res., 1987, 15, 9099.
- 75 LAVERGNE JM, BAHNAK BR, ASSOULINE Z, PIETU G, KERBIRIOU-NABIAS D, MEULIEN P, PAVIRANI A, MEYER D. A Taq I polymorphism in the 5' region of the von Willebrand factor (vWF) gene. Nucleic Acids Res., 1988, 16, 2742.
- 76 LAWN RM. The molecular genetics of hemophilia : blood clotting factor VIII and IX. Cell, 1986, 42, 405-406.
- 77 LEVINSON B, KENWRICK S, LARICH D, HAMMONDS G, GITSCHIER J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. Genomics, 1990, 7, 1-11.
- 78 LEVINSON B, JANCO R, PHILLIPS J et al. A novel missense mutation in the factor VIII gene identified by analysis of amplified hemophilia DNA sequences. Nucleic Acids Res., 1987, 15, 9597-9805.

- 79 LILLICRAP D, TAYLOR SAM, GROVER H, TEITEL J, GILES AR, HOLDEN JJA, WHITE BN. Genetic analysis in hemophilia A. Identification of a large FVIII gene deletion in a patient with high titre antibodies to human and porcine FVIII. Blood, 1986, 68, 337.
- 80 LINSTEDT M, ANVRET M. An Eco RI polymorphism of the human von Willebrand factor cDNA. Nucleic Acids Res., 1989, 17, 2882.
- 81 LOZIER JN, MONROE DM, STANFIELD OAKLEY SA et al. Blood, 1990, 75, 1097-1104.
- 82 LYON MF. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. Am. J. Hum. Genet., 1962, 14, 135.
- 83 LYONS S, BRUCK ME, BOWIE EJW, MONTGOMERY RR, GILL JC, YANG AY, GINSBURG D. Molecular basis of type IIA von Willebrand disease (vWD). Abstract 1989
- 84 Mc GRAW RA, DAVIS LM, LUNDBALD RL, STANFORD DW, ROBERTS HR. Structure and function of factor IX : defects in haemophilia B. Clin. Haematol., 1985, 14, 359.
- 85 MANCUSO DJ, TULEY EA, WESTFIELD LA, WORRALL NK, SHELTON-INLOES BB, SORACE JM, ALEVY YG, SADLER JE - Structure of the Gene for Human von Willebrand Factor. The J. Biol. Chem., 1989, 264, 19514-19527.
- 86 MANNUCCI PM, BLOOM AL, LARRIEU MJ, NILSON M, WEST RM. Artherosclerosis and von Willebrand Factor. Br. J. Haematol., 1984, 57, 163-169.
- 87 MARCHETTI G, SACCHI E, PATRACCHINI P, RANDI AM, SAMPIETRO M, BERNARDI F. Two additional Taq I RFLPs in von Willebrand factor gene (vWF) and pseudogene. Nucleic Acids Res., 1989, 17, 3329.
- 88 MARTI T, ROSSELET SJ, TITANI K, WALSH KA. Identification of disulfide-bridged substructures within Human von Willebrand Factor. Biochemistry, 1987, 26, 8099- 8109.
- 89 MATSUSHITA T, TANIMOTO M, YAMAMOTO K, SUGIURA I, HAMAGUCHI M, TAKAMATSU J, KAMIYA T, SAITO H. DNA sequence analysis of three inhibitor-positive hemophilia B patients without gross gene deletion : identification of four mutations in factor IX gene. J. Lab. Clin. Med., 1990, 116, 492-497.
- 90 MATTHEWS RJ, ANSON DS, PEAKE IR, BLOOM AL. Heterogeneity of the factor IX locus in nine hemophilia B inhibitor patients. J. Clin. Invest., 1987, 79, 746-753.

- 91 MAZURIER C, GAUCHER C, JORIEUX S, PARQUET-GERNEZ A, GOUDEMAMND M. Evidence for a von Willebrand factor defect in factor VIII binding in three members of a family previously misdiagnosed mild haemophilia A and haemophilia carriers - Consequences for therapy and genetic counselling. Br. J. Haemat., 1990, 76, 372-379.
- 92 MAZURIER C, DIEVAL J, JORIEUX S, DELOBEL J, GOUDEMAMND M. A new von Willebrand factor (vWF) defect in a patient with factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWF. Characterization of abnormal vWF/FVIII interaction. Blood, 1990, 75, 20-26.
- 92b MAZURIER C. Purification biochemistry and structure, fonction relationships of vWF. FACTOR VIII-von WILLEBRAND FACTOR, ed by MJ SEGATCHIAN and GF SAVIDGE, vol 1, p41, CRC Press, Boca, Raton.
- 93 MILLAR DS, STEINBRECHER RA, WIELAND K, GRUNDS CB, MARTINOWITZ U, KRAWCZAK M, ZOLL B, WHITMORE D, STEPHENSON J, MIBASHAN RS, KAKKAR VV, COOPER DN. The molecular genetic analysis of hemophilia A : characterization of six partial deletions in the factor VIII gene. Hum. Genet., 1990, 86, 219-227.
- 94 MILLER S, DYKES DD, POLESKY HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Res., 1988, 3, 1215.
- 95 MIKAMI S, NISHIMURA T, NAKA H, KUZE K, FUKUI H. A deletion involving intron 13 and exon 14 of factor VIII gene in a haemophiliac with anti-factor VIII antibodies. Jpn. J. Hum. Genet., 1988, 33, 401-407.
- 96 MONTGOMERY RR and ZIMMERMAN TS. J. Clin. Invest., 1978, 61, 1498-1507.
- 97 MULLIGAN L, HOLDEN JHA, WHITE BN. A DNA marker closely linked to the factor IX (hemophilia B) gene. Hum. Genet., 1987, 75, 381-383.
- 98 Mullis K.B., Faloona F.B., Scharf S., Saiki R.K., Horn G., Erlich H.- Specific enzymatic amplification of DNA in vitro : the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1986, 85, 6252-6256.
- 99 NACHAM R, LEVINE R and JAFFE EA. J. Clin. Invest., 1977, 60, 914-921.
- 100 NISHINO K, LYNCH D.C. A polymorphism of the human von Willebrand factor (vWF) gene with Bam HI. Nucleic Acids Res., 1986, 14, 4697.

- 101 NGO KY, GLOTZ VT, KOZIOL JA, LYNCH DC, GITSCHIER J, RANIERI P, CIAVARELLA N, RUGGERI ZM, ZIMMERMAN TS. Homozygous and heterozygous deletions of the von Willebrand factor gene in patients and carriers of severe von Willebrand disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 2753-2757.
- 102 NORDFANG O, EZBAN M. Generation of active coagulation factor VIII from isolated subunits. J. Biol. Chem., 1988, 263, 1115.
- 103 OBERLE I, CAMERINO G, HEILIG R, GRUNEBAUM L, CAZENAVE JP, CRAPANZANO C, MANNUCCI PM, MANDEL JL. Genetic screening for hemophilia A (classic hemophilia) with a polymorphic DNA probe. N. Engl. J. Med., 1985, 312, 682.
- 104 PATRACCHINI P, CALZOLARI E, AIELLO V, PALAZZI P, BANIN P, MARCHETTI G, BERNARDI F. Sublocalization of von Willebrand factor pseudogene to 22q11.22-q11.23 by in situ hybridization in a 46,X,t(X;22)(pter;q11.21) translocation. Hum. Genet., 1989, 83, 264-266.
- 104b PATTINSON JK, MILLAR DS, Mc VEY JH, GRUNDY CB, WIELAND K, MIBASHAN RS, MARTINOWITZ U, TAN-UN K, VIDAUD M, GOOSENS M, SAMPIETRO M, MANNUCCI PM, KRAWCZAK M, REISS J, ZOLL B, WHITEMORE D, BOWCOCK S, WENSLEY R, AJANI A, MITCHELL V, RIZZA C, MAIA R, MAYNE EE, SCHWARTZ M, GREEN PJ, KAKKAR VV, TUDDENHAM EGD, cooper dn. The molecular genetic analysis of hemophilia A : A directed search strategy for the detection of point mutations in the human factor gene. Blood, 1990, 76, 2242-2248.
- 105 PAVIRANI A, MEULIEN P, HARRER H, DOTT K, MISCHLER F, WIESEL ML, MAZURIER C, CAZENAVE JP, LECOCQ JP. Two independent domains of factor VIII co-expressed using recombinant vaccinia viruses have procoagulant activity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 145, 234.
- 106 PEAKE IR, FURLONG BL, BLOOM AL et al. Carrier detection by direct gene analysis in a family with haemophilia B (factor IX deficiency). Lancet, 1984, 1, 242-243.
- 106b PEAKE IR, MOON PA, LIDDELL MB, SADLER JE, BLOOM AL. Family studies and prenatal diagnosis in von Willebrand's diseases by PCR amplification of a variable repeat DNA sequence within the von Willebrand factor gene. Résumé, 12ème congrès de la Société Internationale de Thrombose et Hémostase, Tokyo, 1988.
- 107 PEAKE IR, BOWEN D, BIGNELL P, LIDDEL MB, SADLER JE, STANDEN GR, BLOOM AL. Family studies and prenatal diagnosis in severe von Willebrand disease by polymerase chain reaction amplification of a variable number tandem repeat region of the von Willebrand factor gene. Blood, 1990, 76, 555-561.

- 108 PEAKE IR, LIDDEL MB, MOODIE P, STANDEN G, MANCUSO DJ, TULEY EA, WESTFIELD LA, SORACE JM, SADLER JE, VERWEIJ CL, BLOOM AL. Severe type III von Willebrand's disease caused by deletion of exon 42 of the von Willebrand factor gene: Family studies that identify carriers of the condition and a compound heterozygous individual. Blood, 1990, 75, 654-661.
- 109 PIETU G, RIBBA AS, MEULIEN P, MEYER D. Localization within the 106 N-terminal amino acids of von Willebrand factor (vWF) of the epitope corresponding to a monoclonal antibody which inhibits vWF binding to factor VIII. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989, 163, 618.
- 110 PITTMAN DD, KAUFMAN RJ. Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (factor VIII). Proc. Natl. Acad. Sci., 1988, 85, 2429.
- 111 PLOOS VAN AMSTEL HK, REITSMA PH. Tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. Nucleic Acids Res., 1990, 18, 4957.
- 112 QUADT R, VERWEIJ CL, DE VRIES CJM, BRIET E, PANNEKOEK H. A polymorphic Xba I site within the human von Willebrand factor (vWF) gene identified by a vWF cDNA clone. Nucleic Acids Res., 1986, 14, 7139.
- 113 RODEGHIERO F, CASTAMAN G, DINI E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. Blood, 1987, 69, 454-459.
- 113b SADLER JE, MANCUSO DJ, TULEY EA, WESTFIELD LA, WORRAL NK, ALEVY YG. Molecular genetics of von Willebrand disease. Résumé, 12^e congrès de la Société Internationale de Thrombose et Hémostase à Tokyo.
- 114 SAIKI RK, SCHARF S, FALONA R et al. Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 1985, 230, 1350-1354.
- 115 SAIKI RK, GELFAND DH. Introducing AmpliTaq DNA polymerase. Amplification, 1989, 1, 4-6.
- 116 SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S and al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 1988, 239, 487-491.
- 117 SANGER F, NICKLEIN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 5463-5467.
- 118 SARKAR G, SOMMER. Shedding light on PCR contamination, Nature, 1990, 343, 27.
- 119 SCOTT DM, GRIFFIN B, PEPPER DS. The binding of purified factor VIII/von Willebrand factor to collagens of differing type and form. Thromb. Res., 1981, 24, 467.

- 120 SIGURET V, AMSELEM S, VIDAUD M et al. Identification of a CpG mutation in the coagulation factor IX gene by analysis of amplified DNA sequences. Br. J. Haematol., 1988, 70, 411-416.
- 121 SOUTHERN EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 1975, 98, 503-517.
- 122 SPITZER SG, PENDURTHI UR, KASPER CK, BAJAJ SP. Molecular defect in factor IX Bm lake Elsinore. J. Biol. Chem., 1988, 263, 10545-10548.
- 123 SPORN LA, CHAVIN SI, MARDER VJ, WAGNER DD. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. J. Clin. Invest., 1985, 76, 1102-1106.
- 124 STANDEN GR, BIGNELL P, BOWEN DJ, PEAKE IR, BLOOM AL. Family studies in von Willebrand's disease by analysis of restriction fragment length polymorphism and an intragenic variable number tandem repeat (VNTR) sequence. Br. J. Haemat., 1990, 76, 242-249.
- 125 SHELTON-INLOES BB, CHEHAB FF, MANNUCCI PM, FEDERICI AB, SADLER JE. Gene deletions correlate with the development of alloantibodies in von Willebrand disease. J. Clin. Invest., 1987, 79, 1459-1465.
- 126 SURIN VL, ZHUKOVA EL, KRUTOV AA, SOLOVYEV GY, GRINEVA NI. Simple and convenient detection of a Hind III polymorphic site in intron 19 of factor VIII using PCR. Nucleic Acids Res., 1990, 18, 3432.
- 127 TAKAHASHI Y, KALIFATIS M, GIRMA JP, SEWERIN K, ANDERSSON LO, MEYER D. Localization of a factor VIII binding domain on a 34 KDa fragment of the N-terminal portion of von Willebrand factor. Blood, 1987, 70, 1679-1682.
- 128 TANOMOTO M, KOJIMA T, KAMIYA T et al. DNA analysis of seven patients with hemophilia B who have anti-factor IX antibodies : relationship to clinical manifestations and evidence that the abnormal gene was inherited. J. Lab. Clin. Med., 1988, 112, 307-313.
- 129 TAYLOR SAM, BRIDGE PJ, LILLICRAP DP. A Bst XI polymorphism detected by the factor VIII genomic probe p.482.6(F8C). Nucleic Acids Res., 1989, 17, 6426.
- 130 TAYLOR SAM, LILLICRAP DP, BRANCHETTE V, GILES AR, HOLDEN JJA, WHITE BN. A complete deletion of the factor gene and new Taq I variant in a hemophilia B kindred. Hum. Genet. 1988, 79, 273-276.
- 131 THOMPSON AR - Prog. Hemost. Tromb. 1990, 10, in press.

- 132 TOOLE JJ, PITTMAN DD, ORR EC, MURTHA P, WESLY LC, KAUFMAN RJ. A large region (95 kDa) of human factor VIII is dispensible for in vitro procoagulant activity. Proc. Natl. Acad. Sci., 1986, 4, 333.
- 133 TOOLE JJ, KNOPH JL, WOZNEY JM, SULTZMAN LA, BUECKER JL, PITTMAN DD, KAUFMAN RJ, BROWN E, SCHOEMAKER C, ORR EC, AMPHLETT GW, FASTER B, COE ML, KNUTSON GJ, FASS DN, HEWICK RM. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. Nature, 1984, 312, 342.
- 134 VIDAUD M, CHABRET C, GAZENGEL C, GRUNEBAUM L, CAZENAVE JP, GOOSENS M. A de novo intragenic deletion of the potential EGF domain of the factor IX gene in a family with severe hemophilia B. Blood, 1986, 68, 961-963.
- 135 VERWEIJ CL, HOFKER M, QUADT R, BRIET E, PANNEKOEK H. RFLP for a human von Willebrand factor (vWF) cDNA clone, pvWF1100. Nucleic Acids Res., 1985, 13, 8289.
- 136 WADELIUS C, BLOMBACK M, PETTERSSON U. Molecular studies of haemophilia B in Sweden. Hum. Genet., 1988, 81, 13-17.
- 137 WEBSTER WP, ZUKOSKI CF, HUTCHIN P, REDDICK RL, MANDEL SR, PENICK GP. Plasma factor VIII synthesis and control as revealed by canine organ transplantation. Am. J. Physiol., 1971, 220, 1147.
- 138 WEISS HJ, SUSSMAN II, HOYER LW. Stabilization of the factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. J. Clin. Invest., 1977, 60, 390-394.
- 139 WINK T, DE GROOT PG, FEDERICI AB, MANNUCCI PM. The molecular defect in a von Willebrand disease type IIB patient. Abstract, 1989.
- 140 WINSHIP PR, ANSON DS, RIZZA CR, BROWNLEE GG. Carrier detection in hemophilia B using two further intragenic restriction fragment length polymorphisms. Nucleic Acids Res., 1984, 12, 8861-8872.
- 141 WINSHIP PR, REES DJG, ALKAN M. Detection of polymorphisms at cytosine phosphoguanadine dinucleotides and diagnosis of hemophilia B carriers. Lancet, 1989, march 25, 631.
- 142 WION KL, TUDDENHAM GD, LAWN RM. A new polymorphism in the factor VIII gene for prenatal diagnosis of hemophilia A. Nucleic Acids Res., 1986, 14, 4535.
- 143 WION KL, SUMMERFIELD JA, TUDDENHAM EGD, LAWN RM. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. Nature, 1985, 317, 726.
- 144 WHITE GC, SHOEMAKER CB. Factor VIII gene and hemophilia A. Blood, 1989, 73, 1-12.

- 145 WOODS-SAMUELS P, KAZAZIAN HH, ANTONARAKIS SE. Molecular characterization of four deletions in the human factor VIII gene in patients with hemophilia A. Am. J. Hum. Genet., 1989, 45, A230.
- 146 WU QY, BAHNAK BR, COULOMBEL L, KERBIRIOU NABIAS D, DROUET L, PIETU G, MEULIEN P, PAVIRANI A, CAEN JP, MEYER D. Analysis of von Willebrand factor mRNA from the lung of pigs with severe von Willebrand disease by using a human cDNA probe. Blood, 1988, 71, 1341-1388.
- 147 YOSHITAKE S, SCHACH BG, FOSTER DC, DAWIE EW, KURACHI K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). Biochemistry, 1985, 24, 3736-3750.
- 148 YOUSSEOUFIAN H, ANTONARAKIS SE, PHILLIPS DG, ARONIS S, TSIFTIS G, KAZAZIAN HH. Characterization of five partial deletions of the factor VIII gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 3772-3776.
- 149 YOUSSEOUFIAN H, KASPER CK, PHILLIPS DG, KAZAZIAN HH, ANTONARAKIS SE. Restriction endonuclease mapping of six novel deletions of the factor VIII gene in hemophilia A. Hum. Genet., 1988, 80, 143.
- 150 YOUSSEOUFIAN H, KAZAZIAN HH, PHILLIPS DG et al. Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutations hotspots. Nature, 1986, 324, 380-382.
- 151 YOUSSEOUFIAN H, KAZAZIAN HH, BELL W ET AL. Non sense and missense mutations in hemophilia A : estimate of the relative mutation rate at CG dinucleotides. Am. J. Hum. Genet., 1988, 42, 718-725.
- 152 YOUSSEOUFIAN H, PHILLIPS DG, KAZAZIAN HH, ANTONARAKIS SE. Msp I polymorphism in the 3' flanking region of the human factor VIII gene. Nucleic Acids Res., 1987, 15, 6312.

ANNEXE

LISTE DES AMORCES

facteur VIII

AMPLIFICATION A PARTIR D'ADN :

exon 22 : fragment amplifié de 155 pb

9 TGGATCCGTTGGCACCAATGA
10 CATTAAAGCTTCCAGTGGAAT

exon 23 : fragment amplifié de 145 pb

18 GTCTTCTTTGGCAATGTGGA
19 TATTATCACAGCCCATCAACTC

exon 24 : fragment amplifié de 148 pb

11 TTGCAGCATGCCATTGGGAA
12 CTGAGCTCTCCAGGCATTAC

exon 26 : fragment amplifié de 205 pb

13 GAAATCTAGACTCCTTCACA
14 CTGCCCTGGAGCTGAGGAGGG

polymorphisme Bcl I (71): fragment amplifié de 163 pb

P1 TAAAAGCTTTAAATGGTCTAGGC
P2 TTCGAATTCTGAAATTATCTGTTC
P1b GAGTTATAAAGGATGCTCTGATCAAAGCTTTAAATGGTCTAGGC

polymorphisme Xba I (71) : fragment amplifié de 67 pb

H3 ACGGAATTCGTGACCCTAATTCCATG
H4 GGGCTGCAGGGGGGGGGGACAACAG

polymorphisme Hind III (126) : fragment amplifié de 730 bp

C3 TTGGCGAGCATCTACATGCT
C4 CTAATGTGTCCAGAAGCCAT

AMPLIFICATION A PARTIR D'ARN :

amorces 9 + 12 décrites ci-dessus

facteur IX

exon 1 :
fragment amplifié de 458 pb

11 CTCAAGAATTCCACAGTGGCAGAAGCCC
12 AGAACCAGTACTTACCAACCTGCTG

exon 2 + 3 :
fragment amplifié de 529 pb

1 TGGATTAAAAACAAAGACTT
2 AAACCCACATAATTCTCAT

exon 4 + polymorphisme Taq I :
fragment amplifié de 998 pb

17 CATCCCAATGAGTATCTACAGGGGAGGA
18 AGTGAATTCCCTCATTTCGCACTGTGTGCGTTTCT

exon 5 :
fragment amplifié de 329 pb

15 TATTTGACCCATACATGAGTCAGTAGTT
16 TGATTTCAAAGGAAGCAGATTCAAGTAGG

exon 6 :
fragment amplifié de 392 pb

13 TAAATACTGATGGGCCTGCTTCTC
14 CTCCCACCTGGCCTGTGTCTTGCCAG

exon 7 :
fragment amplifié de 256 pb

3 GCCTATTCCTGTAACCAGCACAC
19 CAATCATATTAAGAGCTAGTGG

exon 8 :
fragment amplifié de 653 pb

4 GGCCCTGTAAATTTCAATTCC
20 TCTGTGTATGTGAAATACTGTT

facteur IX

polymorphisme Dde I :

fragment amplifié de 390 pb
340 pb

6 CTGAAGAGACACTCCTGAACTCTGGAGG
9 GGGACCACTGTCGTATAATG

polymorphisme Hha I (141) : fragment amplifié de 230 pb

H1 ACAGGCACCTGCCATCACTT
H2 AGATTTCAAGCTACCAACAT

facteur Willebrand

AMPLIFICATION A PARTIR D'ADN :

exon 18 : fragment amplifié de 289 pb

15 AGACTCTAGAGGACCAAAGGACA
16 GAAAACTGCAGGGCAGGCACCCAG

exon 19 + polymorphisme intron 19 : fragment amplifié de 227 pb

17 AGGGCTTTAGATCAGTCACTGTGGCCCT
18 TGGCCGCGTGCACCCTCACTCCACC

exon 20 : fragment amplifié de 358 pb

19 TCCATGGTCTAGATGGGCCCT
20 AACCTGAGCTCACACCTCCCACC

exon 21 : fragment amplifié de 251 pb

21 CCAAGCTTCTGGTCTGGTGAGAG
22 GGCAGGAGCTCAAAGCGGGACA

exon 22 : fragment amplifié de 257 pb

23 AGGATCCGGCTGTCGAGCCTGCC
24 CACTCCAAAGGCCAAGTCCCCAACAA

exon 23 + 24 : fragment amplifié de 451 pb

25 CTCCTGGTCTAGACGGTGCT
26 CCTGGTACCGTCTGCTTCCCAC

polymorphisme intron 40 : fragment amplifié de taille variable

31 GCCCTAGTGGATGATAAGAATAATCAG
32 GCAGACTTCTACTGTTTTAGGTAAGTG

facteur Willebrand

AMPLIFICATION A PARTIR D'ARN :

fragment comprenant une partie de l'exon 19 et une partie
de l'exon 20 :

fragment amplifié de 189 pb

5 GTGTGGATCCGGAAAGGTGTCCCTGCTTCC
6 GGTATTGGATCCCGTCGAAGGTGAGGTAGTG

Toutes les séquences des amorces sont inscrites dans
le sens 5' vers 3'.

