

**UNIVERSITE DE NANTES**

---

**FACULTE DE MEDECINE**

---

Année 2004

N°118

**THESE**

pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

Qualification en Biologie Médicale

par

Armelle BETTEMBOURG

Née le 10 février 1975 à NANCY

---

Présentée et soutenue publiquement le 21 septembre 2004

---

**INTERET DE L'ETUDE DE LA LIAISON DU FACTEUR  
WILLEBRAND AU COLLAGENE (VWF:CB):  
ETUDE CHEZ 49 PATIENTS**

---

Président: Monsieur le Professeur Jean-Yves MULLER

Directeur de thèse: Madame le Docteur Edith FRESSINAUD

Membres du jury: Monsieur le Professeur Hervé AVET-LOISEAU

Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD

A Madame le Docteur Edith FRESSINAUD, vous m'avez fait l'honneur de me confier ce travail et de le diriger. Vous m'avez chaleureusement accueillie dans votre unité et fait profiter de votre expérience dans le domaine de l'hémostase. Veuillez trouver ici, Madame, l'expression de ma gratitude et de ma profonde admiration

A Monsieur le Professeur Jean-Yves MULLER, vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Je n'oublierai pas votre souci de l'enseignement et le temps que vous avez pris pour me conseiller dans mon orientation professionnelle. Recevez ici, Monsieur, l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

A Messieurs les Professeurs Hervé AVET-LOISEAU et Jean-Marie BARD, vous m'avez fait bénéficier de votre enseignement et aujourd'hui vous me faites l'honneur de juger ce travail, je vous en remercie.

Aux Docteurs Marianne SIGAUD, Florence TRUCHAUD, Sophie VOISIN et Marc TROSSAERT, je vous exprime ici toute ma reconnaissance pour m'avoir fait partager votre expérience et pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

# **SOMMAIRE**

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>4</b>
<b>HISTORIQUE</b> .....	<b>5</b>
<b>LE FACTEUR WILLEBRAND</b> .....	<b>6</b>
1. Synthèse et sécrétion: .....	6
2. Structure: .....	8
3. Rôle du VWF dans l'hémostase:.....	9
4. Régulation de la taille des multimères dans la circulation: .....	15
<b>LA MALADIE DE WILLEBRAND</b> .....	<b>16</b>
1. Manifestations cliniques:.....	16
2. Diagnostic biologique: .....	16
3. Classification:.....	25
4. Diagnostics différentiels:.....	31
5. Traitement: .....	33
6. Le diagnostic prénatal: .....	36
<b>OBJECTIF DE L'ETUDE</b> .....	<b>37</b>
<b>MATERIEL ET METHODE</b> .....	<b>38</b>
1. Populations:.....	38
2. Protocole opératoire pour l'étude de la liaison du VWF au collagène (VWF: CB).....	46
3. Analyse statistique: .....	48
<b>RESULTATS</b> .....	<b>49</b>
1. Evaluation analytique de la méthode: .....	49
2. Résultats dans la population témoin:.....	53
3. Résultats dans la population étudiée: .....	54
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>64</b>
1. Méthodologie: .....	64
2. Etude du VWF:CB chez les sujets sains: .....	66
3. Place du VWF:CB dans le diagnostic et le typage de la VWD constitutionnelle:.....	67
4. VWF:CB et syndrome de Willebrand acquis:.....	71
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>72</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>73</b>

## **ABREVIATIONS UTILISEES:**

- **a.a.:** acide-aminé
- **AVWS :** Syndrome de Willebrand acquis
- **FVIII :** Facteur VIII
- **GpIb :** Glycoprotéine Ib
- **GpIIb-IIIa :** Glycoprotéine IIb-IIIa
- **HPM :** Haut Poids Moléculaire
- **IPM :** Poids moléculaire intermédiaire
- **MGUS :** Gammopathie monoclonale de signification indéterminée
- **PFA :** Platelet Function Analyzer
- **RAo :** Rétrécissement Aortique
- **TO :** Temps d'occlusion
- **THPM :** Très haut poids moléculaire
- **VWD :** Maladie de Willebrand
- **VWF :** protéine mature du facteur Willebrand (Goodeve et al., 2001)
- **VWF:Ag :** antigène du facteur Willebrand (Goodeve et al., 2001)
- **VWF:CB :** capacité de liaison du facteur Willebrand au collagène (Goodeve et al., 2001)
- **VWF:FVIIIIB :** capacité de fixation du facteur Willebrand au facteur VIII (Goodeve et al., 2001)
- **VWF:RCo :** activité cofacteur de la ristocétine du facteur Willebrand (Goodeve et al., 2001)

## **INTRODUCTION**

La maladie de Willebrand (VWD) est la maladie hémorragique constitutionnelle, de transmission autosomique, la plus fréquente dans le monde. Elle touche en effet 1% de la population, tous sexes confondus (Rodeghiero et al., 1987). Cependant elle est très hétérogène dans son expression clinique et biologique, et la prévalence des formes symptomatiques serait environ de 100 cas par million (Rodeghiero, 2002).

Cette maladie est liée à un déficit qualitatif ou quantitatif du facteur Willebrand (VWF), protéine qui joue un rôle essentiel dans l'hémostase primaire en induisant l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium, puis l'agrégation des plaquettes sur le site d'une lésion vasculaire. Cette protéine est également responsable du chaperonnage et du transport du facteur VIII (FVIII), jouant ainsi un rôle indirect dans la coagulation.

Il existe trois grands groupes dans cette maladie, selon que le déficit en VWF est quantitatif total ou partiel, ou qualitatif. Pour les déficits de type qualitatif ou quantitatif total, de nombreuses mutations sur le gène codant pour le VWF ont été découvertes et étudiées. Les anomalies moléculaires responsables des déficits quantitatifs partiels (les plus fréquents) sont moins bien connues.

Les manifestations hémorragiques sont hétérogènes et dépendent du type de la maladie. Il en résulte une prise en charge thérapeutique différente et adaptée à la sévérité de la maladie et à la réponse au traitement.

Le diagnostic est posé sur un faisceau d'arguments clinico-biologiques. Les signes d'appels sont le plus souvent hémorragiques dans les formes les plus sévères. La présentation biologique est aussi hétérogène et les tests de dépistage peuvent être en défaut, imposant la réalisation de tests spécifiques.

Le but de notre travail est d'évaluer la place, dans le diagnostic et le typage de la VWD, d'une activité fonctionnelle particulière du VWF, qui est sa capacité de liaison au collagène de la matrice sous-endothéliale.

## **HISTORIQUE**

La VWD a été décrite pour la première fois en **1926** par **Erik von Willebrand** (von Willebrand, 1926) chez plusieurs membres d'une famille de l'archipel de Aaland. Dans cette famille, il décrit une fillette de 5 ans présentant de graves symptômes hémorragiques depuis la naissance. Trois de ses sœurs sont mortes d'hémorragie avant l'âge de 4 ans. Deux autres sœurs et trois frères sont indemnes de toute symptomatologie hémorragique. Ses parents et deux autres frères présentent des manifestations cliniques hémorragiques de moindre intensité. Ceci suggérait une maladie à transmission autosomale dominante. Erik von Willebrand distingua cette maladie des autres maladies hémorragiques congénitales déjà individualisées, comme l'hémophilie et la thrombasthénie de Glanzmann, et utilisa le terme de "pseudohémophilie".

Dans les années **1950**, il a été mis en évidence que les patients atteints de VWD avaient un taux de FVIII abaissé. Les saignements et le déficit en FVIII étaient corrigés par la transfusion de concentrés plasmatiques riches en FVIII indiquant que la maladie était due à un déficit d'une protéine sanguine.

Le VWF fut purifié au début des années **1970**, individualisé du FVIII dans les années 1980, et sa séquence fut connue en **1986**. Ces dernières années, de nombreux progrès ont été effectués quant à la compréhension des différentes fonctions du VWF et des anomalies moléculaires de la VWD (Sadler, 1998).

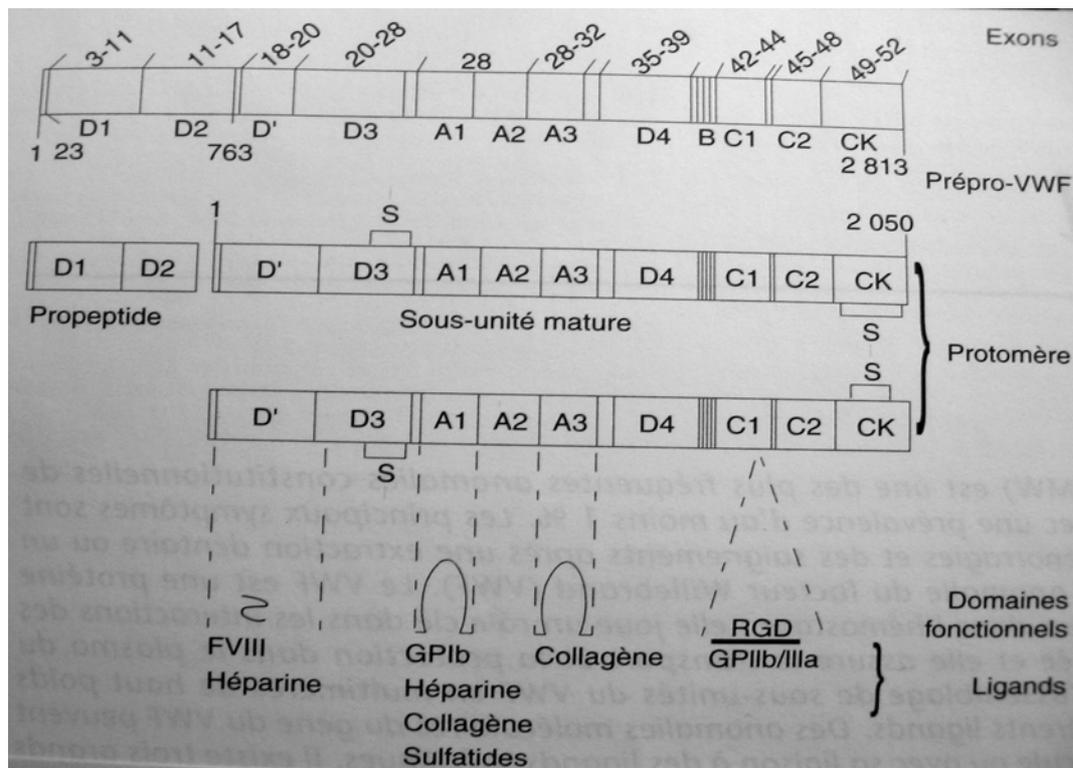
# LE FACTEUR WILLEBRAND

## 1. Synthèse et sécrétion:

### a) Synthèse:

Nous utiliserons la nouvelle nomenclature : la numérotation commence par le premier acide-aminé du peptide signal (Goodeve et al., 2001).

Le gène du VWF est porté par l'extrémité du bras court du chromosome 12 ; il est constitué de 52 exons pour une taille de 180 kb. L'ARNm (environ 9 kb) code pour la synthèse d'un prépro-VWF de 2 813 acides aminés (a.a.). Cette molécule précurseur est constituée d'un peptide signal de 22 a.a., d'un propeptide (antigène Willebrand II) de 741 a.a. et de la sous-unité mature de 2 050 a.a. contenant 4 types de domaines (A,B,C,D) (Fressinaud et Meyer, 2001) (figure 1).



**Figure 1:** Représentation schématique des étapes de la synthèse du VWF d'après E. Fressinaud et D. Meyer

L'expression de ce gène peut se faire dans la majorité des cellules endothéliales de l'organisme humain: veines, artères, capillaires; mais aussi dans les mégacaryocytes, avec une expression différente selon le tissu concerné.

b) La maturation:

Cette molécule subit une première étape de protéolyse par une signal peptidase, libérant le pro-VWF constitué de la répétition à 4 ou 5 exemplaires de quatre types de domaines A, B, C et D, et qui représentent 90% de la protéine . Ces domaines son arrangés selon le modèle suivant: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK.

Ce pro-VWF est également caractérisé par la présence d'une séquence Arg-Gly-Asp (séquence RGD); Située dans le domaine C1, elle est impliquée dans le rôle que joue le VWF dans l'agrégation plaquettaire.

Après le clivage du peptide signal, le pro-peptide passe dans le réticulum endoplasmique où il subit des étapes de dimérisation et de glycosylation.

La dimérisation se fait entre les extrémités C terminales de deux monomères de pro-VWF, par l'intermédiaire de ponts di-sulfures localisés au niveau du domaine CK. Le dimère ainsi formé est transporté à travers l'appareil de Golgi, où se produit une sulfatation, une O-glycosylation et une polymérisation. Puis le pro-VWF est transporté dans le réseau Golgien où il subit successivement une multimérisation et un clivage protéolytique par une endoprotéase après l'Arginine en position 763, conduisant à la formation de multimères de VWF et de dimères de propeptide. Le VWF multimérisé peut passer dans le secteur intracellulaire (Romani de Wit T. et van Mourik J., 2001)

c) Le stockage:

Les cellules endothéliales et les mégacaryocytes sont les seules cellules de l'organisme capables de synthétiser du VWF.

Dans les cellules endothéliales, la protéine mature est stockée dans des granules spécifiques, les corps de Weibel-Palade, d'où elle sera sécrétée vers le secteur plasmatique. La structure de ces granules est constituée de tubules longitudinaux, structures dérivées de l'appareil de Golgi, qui semble être liés à la structure multimérique du VWF. En effet, la présence de corps de Weibel-Palade dans une cellule serait directement liée à la présence de VWF, qui serait capable d'induire la synthèse de ses propres vésicules de stockage (Denis, 2003).

Dans les plaquettes, la protéine est stockée dans les granules alpha.

d) La sécrétion:

Elle se fait selon deux voies différentes, la première est constitutionnelle et induit la synthèse directe de VWF. La seconde est régulée et implique le stockage puis le relargage du VWF; cette voie est la seule empreintée par le VWF mégacaryocytaire. Le VWF plasmatique est essentiellement d'origine endothéliale (Ruggeri(1), 2003).

La sécrétion de VWF à partir des granules de stockage se fait en réponse à une stimulation extérieure qui provoque l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ( $Ca^{2+}$ ) ou l'élévation du taux d'AMP cyclique (AMPC). Ces stimuli entraînent la migration des corps de Weibel-Palade ou des granules alpha plaquettaires, du compartiment cytoplasmique vers le compartiment membranaire, où la membrane des vésicules va fusionner avec la membrane plasmatique et provoquer l'exocytose du VWF dans le compartiment plasmatique.

Une réponse différente aux stimuli a été observée en fonction du second messenger mis en jeu: s'il s'agit du  $Ca^{2+}$ , les granules périphériques et centraux sont concernés; dans le cas de l'AMPC, seules les vésicules périphériques sont mobilisées (Romani de Wit T. et van Mourik J., 2001).

## **2. Structure:**

a) Le monomère:

Chaque monomère possède les mêmes domaines responsables des interactions avec d'autres molécules, c'est à dire les mêmes sites fonctionnels. Il est actif séparément et possède les caractéristiques suivantes:

- Sur 2050 a.a., 169 sont des résidus cystéine regroupés en domaines aux extrémités N et C terminales et responsables de la formation de ponts di-sulfures intra ou interchaînes.
- Forte teneur en carbohydrates (18%)
- Formation de deux boucles de 185 a.a., une dans le domaine A1 (entre les cystéines 1 272 et 1 458) et une dans le domaine A3 (entre les cystéines 1 686 et 1 872).
- Présence d'une séquence RGD au niveau du domaine C1, entre les a.a. 2 507 et 2 509.

(Fressinaud et Meyer, 2001)

b) Les multimères:

Le VWF plasmatique est une glycoprotéine constituée de 2 050 a.a., circulant sous forme de multimères de taille variable, dont la structure est filamenteuse mesurant environ 1 300 nm de long pour un diamètre de 200 à 300 nm. Le plus petit polymère en circulation est formé de deux sous-unités de 2 050 a.a. liées par un pont di-sulfure à l'extrémité C terminale ; cette structure forme le **protomère** dont le poids moléculaire est de 500 kDa.

La molécule mature de VWF est faite d'un nombre variable de protomères liés par leur extrémité N-terminale et formant ainsi les **multimères**, le VWF étant constitué d'une série de multimères dont les poids moléculaires vont de 500 à 20 000 kDa (Fressinaud et Meyer, 2001).

En microscopie électronique, les multimères de VWF ont une forme linéaire, constituant une chaîne étendue orientée dans la direction du flux sanguin sous l'effet des forces de cisaillement. Les sous-unités du VWF sont toutes identiques au départ, puis modifiées après passage dans la circulation sanguine, d'où l'espacement des multimères après migration sur gel d'agarose (Ruggeri, 2001).

Les multimères de grande taille sont les plus fonctionnels dans les interactions des plaquettes. En effet, ceux-ci créent des liaisons très fortes avec la glycoprotéine Ib (GpIb) plaquettaire, augmentant ainsi leur potentiel hémostatique et thrombogène (Arya et al., 2002).

### **3. Rôle du VWF dans l'hémostase:**

Le VWF a deux fonctions principales, d'une part l'adhésion et l'agrégation des plaquettes au niveau de la paroi vasculaire lésée, d'autre part la survie et le transport du FVIII (Romani de Wit T. et van Mourik J., 2001).

Ces dernières années, de réels progrès ont été faits dans la compréhension des propriétés biologiques du VWF, notamment dans l'étude des effets de la dynamique des fluides sur la réponse plaquettaire à la lésion vasculaire (Ruggeri(2), 2003).

a) Liaison au FVIII:

- Domaine d'interaction avec le FVIII:

Il a été localisé au niveau du domaine D' du VWF entre les a.a.763 à 1035

Le site où se fait l'interaction initiale entre le VWF et le FVIII n'est pas encore connu. Le complexe ne se forme pas dans la cellule mais après sécrétion des deux molécules dans un environnement spécifique.

Deux éléments au niveau du VWF jouent un rôle important dans cette liaison: les a.a. 841 à 859 et les ponts di-sulfures de cette région N terminale qui permettent le maintien de la configuration spatiale nécessaire à la fonctionnalité du site (Ruggeri, 2001).

- Protéine chaperonne du FVIII:

Le VWF assure le transport du FVIII dans la circulation sanguine. Ainsi, tout changement du taux de VWF dans le sang est accompagné d'une modification du taux de FVIII allant dans le même sens. Le VWF est donc indispensable à la stabilisation du taux de FVIII, mais l'inverse n'est pas vrai (Romani de Wit T. et van Mourik J., 2001).

- Protection du FVIII contre la protéolyse:

Un monomère de VWF peut lier une molécule de FVIII, mais in vivo tous les monomères ne sont pas liés à une molécule de FVIII.

Le complexe VWF-FVIII est stable jusqu'à l'endroit où doit se faire la coagulation. Là, il y a dissociation du complexe et le FVIII est activé par la thrombine. Le VWF est donc là pour empêcher l'activation prématurée du FVIII et sa dégradation par la protéine C et le facteur X.

De plus, le VWF contrôle la demi-vie du FVIII en empêchant sa liaison aux récepteurs des lipoprotéines de bas poids moléculaire (LRP). En effet les LRP lient le FVIII et entraînent son internalisation et sa dégradation (Romani de Wit T. et van Mourik J., 2001)

b) Interactions entre les plaquettes et le sous-endothélium:

L'adhésion des plaquettes au sous-endothélium se fait grâce au VWF, qui crée un pont moléculaire entre les plaquettes et la paroi vasculaire lésée (phénomène d'**adhésion** plaquettaire), et entre les plaquettes elles-mêmes (**agrégation** plaquettaire et formation du thrombus) (Fressinaud et Meyer, 2001).

La première étape est la liaison du VWF aux constituants du sous-endothélium. Le changement conformationnel du VWF, induit par cette liaison, active la liaison à la glycoprotéine Ib (GpIb) plaquettaire permettant l'**adhésion** initiale des plaquettes. L'adhésion entraîne l'exposition de la glycoprotéine IIb-IIIa (Gp IIb-IIIa) à la surface des plaquettes, sur laquelle le VWF va venir se fixer, entraînant l'agrégation plaquettaire.

La principale molécule de la matrice extracellulaire capable d'interagir avec le VWF est le collagène sous sa forme fibrillaire. Les rôles respectifs des domaines A1 et A3 du VWF sont fonction du type de collagène impliqué. Le domaine A1 (a.a. 1260 à 1479) permet la liaison au **collagène de type VI**, tandis que le domaine A3 (a.a. 1673 à 1874) est impliqué dans la liaison aux **collagènes de types I et III**.

La vitesse du flux sanguin est maximale au centre du vaisseau sanguin par rapport aux parois, et les forces de cisaillement sont plus importantes au niveau des parois vasculaires.

La structure moléculaire du VWF est faite pour initier l'adhésion plaquettaire dans des conditions de forces de cisaillement importantes, car le VWF s'étend et augmente ainsi son potentiel d'interaction avec son environnement (Siedlecki et al., 1996).

La liaison du domaine A1 avec la GpIb plaquettaire, est l'interaction la plus importante même quand le flux sanguin est élevé, mais elle n'est pas irréversible. Cette fixation permet le maintien en contact des plaquettes avec la surface vasculaire.

D'autres molécules sont importantes pour renforcer l'adhésion, telle la Gp IIb-IIIa qui peut se lier à une séquence RGD du VWF et à d'autres substrats du complexe matriciel. Le VWF quand il est fixé au **collagène** établit des liaisons plus stables avec les autres molécules.

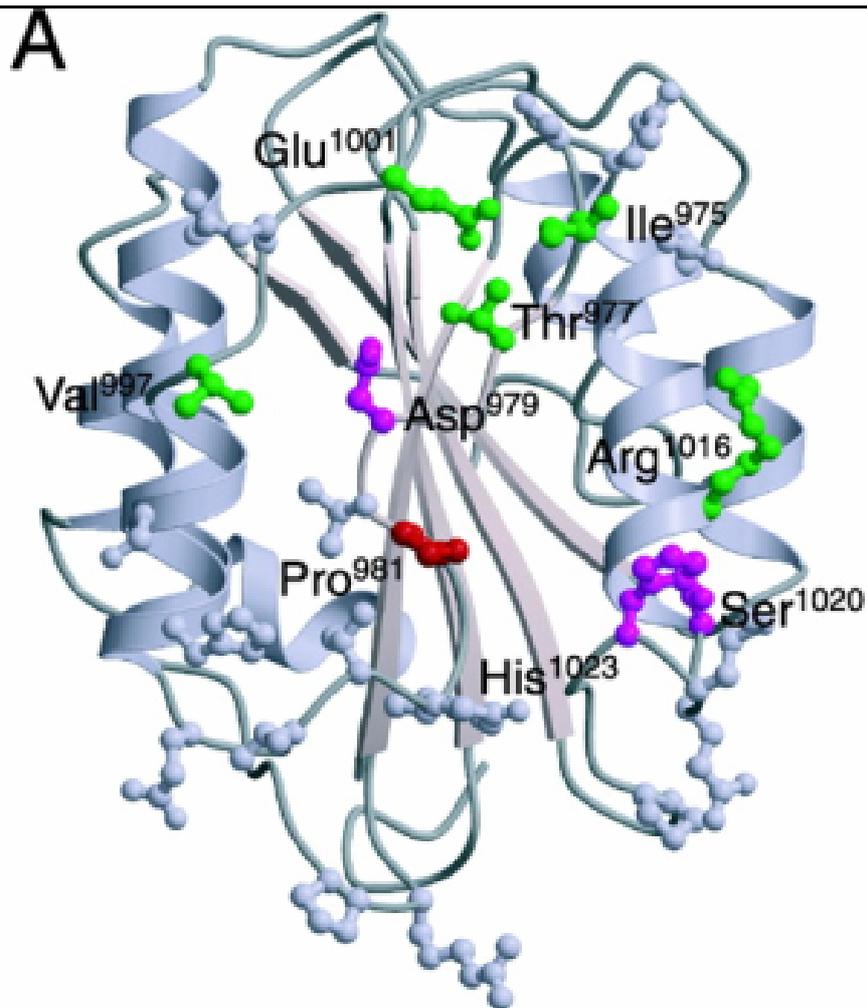
A ce stade, le VWF plasmatique est lié à la surface plaquettaire par la GpIb et la Gp IIb-IIIa. Il forme le substrat grâce auquel les plaquettes adhèrent au sous-endothélium et s'attachent entre elles dans un environnement où les forces de cisaillement sont importantes. Pour obtenir une agrégation plaquettaire stable, il faut que la Gp IIb-IIIa activée soit liée à diverses molécules comme le VWF, le fibrinogène, la fibronectine et le CD 40 ligand (Ruggeri(1), 2003).

- Le domaine de liaison au sous-endothélium (Domaine A3):

Ce domaine situé entre les a.a. Gly 1674 et Glu 2128 (Takahashi et al., 1987), permet la liaison entre le VWF et le collagène sous forme fibrillaire (Romijn et al., 2003).

Sa structure cristallographique est connue (Huizinga et al., 1997) (figure 2).

Ce domaine aurait également un rôle de régulation de la liaison du domaine A1 à la GpIb (Obert et al., 1999a).



**Figure 2:** Structure tridimensionnelle du domaine A3 d'après Huizinga 1997 (Huizinga et al., 1997)

- Domaine de liaison à la GpIb:(domaine A1)

Le domaine A1 est constitué de six feuillets  $\beta$  en position centrale, dont cinq sont parallèles et un est anti-parallèle. Cette structure est entourée par six hélices  $\alpha$ , réparties de part et d'autre des feuillets  $\beta$  (Matsushita et al., 2000) (figure 3).

La GpIb est composée d'une région COOH (extrémité C terminale ou  **$\beta$  switch**) et d'une région NH<sub>2</sub> (extrémité N terminale ou  **$\beta$  finger**). Ces deux régions encadrent la partie centrale de la molécule constituée par la répétition de huit sites riches en leucine (Kobe et Kajava, 2001).

La représentation tridimensionnelle de l'interaction entre le domaine A1 du VWF et la GpIb indique que la **structure globulaire du domaine A1 interagit avec la partie concave de la GpIb** (Huizinga et al., 2002).

Il existe deux régions fortes dans la liaison entre le domaine A1 et la GpIb: la première entre la région  $\beta$  switch de la GpIb et le feuillet  $\beta_3$  et l'hélice  $\alpha_3$  du domaine A1; la seconde entre les régions  $\beta$  finger et la première région riche en leucine de la GpIb, qui interagissent avec les régions  $\alpha_1$   $\beta_2$ ,  $\beta_3$   $\alpha_2$  et  $\alpha_3\beta_4$  (Bonney et al., 2003; Huizinga et al., 2002)

Dans le sang circulant, le VWF soluble n'interagit pas avec les plaquettes. Cette interaction n'a lieu que dans certaines situations:

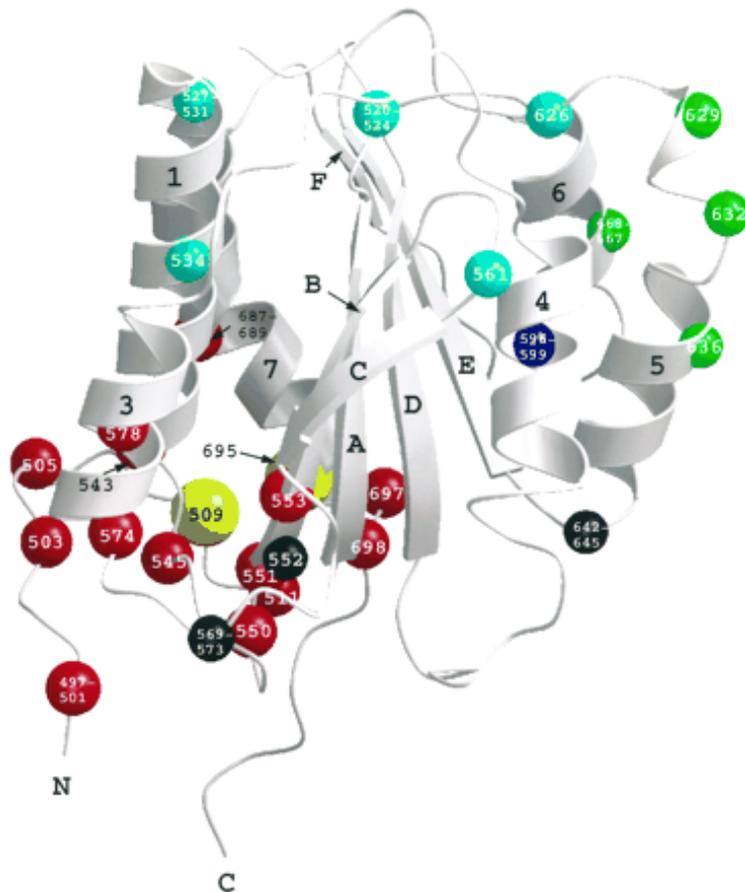
- Roulement des plaquettes sur une surface contenant du VWF immobilisé par sa liaison aux composants de la matrice extra-cellulaire (Bonney et al., 2003; Sadler, 2002).
- Augmentation des forces de cisaillement dans un vaisseau (sténose, microcirculation, ...).
- Mise en présence d'un inducteur type Botrocétine (venin de serpent) qui a la propriété de se lier au VWF, ou la Ristocétine (antibiotique) qui peut se lier aux plaquettes et au VWF (Matsushita et al., 2000). Les sites de liaison de ces deux inducteurs sur la GpIb sont différents, et les changements conformationnels induits sont également différents. (Maita et al., 2003).

Tous ces éléments entraînent un changement conformationnel du domaine A1 du VWF, augmentant ainsi son affinité pour la GpIb (Goto et al., 1995).

La régulation de la liaison entre le domaine A1 du VWF et la GpIb, est assurée par des segments "activateurs" et "inhibiteurs" présents au sein du domaine A1 (Matsushita et Sadler, 1995).

Ces interactions ont été mieux comprises par l'étude des patients atteints d'une forme particulière de VWD de type 2B, où l'on observe une augmentation de l'affinité du domaine A1 pour la GpIb. Dans ce cas, les mutations affectent l'extrémité N terminale qui a normalement une activité inhibitrice de la liaison à la GpIb (Matsushita et Sadler, 1995).

La structure tridimensionnelle du domaine A1 a été déterminée par cristallographie (Fujimura et al., 1987). Le domaine A1 contient également des sites de liaison pour la botrocétine, l'héparine, des sulfatides et des collagènes (Fressinaud et Meyer, 2001).



**Figure 3:** Structure tridimensionnelle du domaine A1. (Emsley et al., 1998)

- Domaine C1 ou séquence RGD:(a.a. 2 507 à 2 509)

Par ce domaine se fait la liaison du VWF à la fibronectine et aux récepteurs des intégrines notamment la fixation à la GpIIb-IIIa. La GpIIb-IIIa est exposée à la surface des plaquettes activées après liaison de la GpIb au VWF.

Cette liaison induit l'étalement des plaquettes et leur adhésion irréversible au sous endothélium, permettant aux plaquettes de ne pas être balayées par des taux de cisaillement élevés (Fressinaud et al., 1988).

- Sites de liaison aux autres ligands:

Le VWF se lie aux glycoprotéines sulfatées présentes au niveau des membranes cellulaires; ces domaines jouent donc un rôle accessoire dans les interactions entre le VWF et les plaquettes.

La fixation du VWF à la fibrine contribue également à l'apposition de plaquettes sur la surface vasculaire lésée.

#### **4. Régulation de la taille des multimères dans la circulation:**

Comme nous l'avons vu précédemment, les multimères les plus grands sont les plus actifs biologiquement. Dans le plasma, la taille des multimères présents est régulée par une métalloprotéase spécifique appelée ADAMTS13 (Furlan et al., 1996; Tsai, 1996), qui assure le clivage du pont Tyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup> de la sous-unité mature du VWF. Ce clivage aboutit à la séparation du multimère en deux sous-unités de plus petites tailles, faisant respectivement 140 et 176 kDa de poids moléculaire apparent, ce qui évite les interactions spontanées entre les plus grands multimères et les plaquettes.

Chez les patients atteints de microangiopathie thrombotique, on retrouve la présence dans le plasma, de multimères de VWF anormalement grands. Ces multimères de grande taille ont la capacité d'induire une agrégation plaquettaire spontanée en conditions de flux sanguin rapide, responsable de la formation de microthrombi vasculaires (Veyradier et al., 2001b).

# LA MALADIE DE WILLEBRAND

## 1. Manifestations cliniques:

L'expression clinique de la VWD est extrêmement **hétérogène**, certains sujets étant totalement asymptomatiques alors que d'autres sont atteints d'un syndrome hémorragique très sévère. L'intensité des symptômes est fonction de l'importance du déficit, qui dépend d'anomalies moléculaires à pénétrance variable, d'où des manifestations hémorragiques pouvant être de sévérité différentes dans une même famille.

La manifestation clinique la plus classique est celle d'un **syndrome hémorragique cutanéomuqueux**: épistaxis, saignements gingivaux, ecchymoses, ménorragies, hémorragies digestives parfois liées à des angiodyplasies. Les hémorragies post-opératoires peuvent être la seule manifestation de la maladie, est sont caractéristiques lorsqu'elles sont observées après **avulsion dentaire, adénoïdectomie** et surtout **amygdalectomie**.

Les hémorragies de la délivrance sont rares dans la plupart des formes modérées, car les concentrations de VWF augmentent suffisamment au cours de la grossesse. On peut cependant observer des phénomènes hémorragiques retardés (8 à 10 jours après l'accouchement) lorsque le VWF revient à sa valeur de base. Dans les déficits quantitatifs sévères ou qualitatifs, l'anomalie persiste pendant la grossesse et le risque hémorragique lors de l'accouchement est important.

Les formes sévères (type 3) caractérisées par un déficit total en VWF et un déficit profond en FVIII comportent en plus des manifestations hémorragiques se rapprochant de celles observées dans l'hémophilie: hématomes, hémarthroses.

L'expression de la maladie peut varier d'une période à l'autre chez un même individu en fonction de l'âge ou des conditions physiologiques et peut aussi varier d'un individu à l'autre au sein d'une même famille.

## 2. Diagnostic biologique:

Du fait de l'hétérogénéité d'expression de la VWD, il n'existe pas un test unique capable de détecter les différentes formes. Le biologiste dispose de trois types de tests: des tests de dépistage, des tests spécifiques, et des tests discriminants (très souvent spécialisés).

a) Les tests de dépistage:

Les tests les plus anciens et les plus classiques sont peu sensibles et des résultats normaux ne permettent pas d'éliminer le diagnostic de VWD (Veyradier et al., 1998).

➤ Bilan d'hémostase d'orientation: Il comprend classiquement le taux de prothrombine (TP), le temps de céphaline avec activateur (TCA), la numération plaquettaire et le temps de saignement (TS).

Le **TP** n'est sensible ni au déficit en FVIII, ni à celui en VWF. Il reste normal dans toutes les formes de VWD.

Le **TCA**, peut être allongé dans certaines formes de VWD et son allongement est parallèle au déficit en FVIII. Mais la sensibilité est médiocre (environ 50%). Dans les variants touchant l'interaction du VWF avec les plaquettes, il est le plus souvent normal ou peu allongé. Dans le variant touchant la fonction de transport du FVIII (type 2N), il est constamment allongé.

Un TCA normal n'exclut pas une VWD et un TCA allongé nécessite une exploration complémentaire.

La **numération plaquettaire** est habituellement normale à l'exception des patients présentant un variant particulier de la maladie (type 2B).

La mesure du **temps de saignement** est le reflet direct de l'hémostase primaire in vivo. Il reflète l'interaction des plaquettes avec la paroi vasculaire et le VWF.

Il existe une corrélation entre le temps de saignement, le chiffre des plaquettes et la valeur de l'hématocrite, et ces données doivent être connues pour interpréter correctement le résultat.

La méthode de référence est la méthode d'IVY incision, qui consiste à réaliser une incision standardisée à la face interne de l'avant-bras, un brassard gonflé à 40 mm de mercure posé au bras. Le temps nécessaire à l'arrêt du saignement est normalement, par cette technique, entre huit et dix minutes.

Ce test manque de reproductibilité car il est opérateur dépendant, il manque aussi de sensibilité et ne présente pas une bonne valeur prédictive du risque hémorragique; sa réalisation n'est d'ailleurs plus recommandée dans le bilan d'hémostase préopératoire systématique (Veyradier et al., 1998).

Ainsi, un temps de saignement normal ne permet pas d'exclure une VWD (Rodgers et Levin, 1990). En effet, celui-ci reste normal dans 50% des VWD de type 1 (Fressinaud et al., 1998)

➤ Le "Platelet Function Analyzer":(PFA)

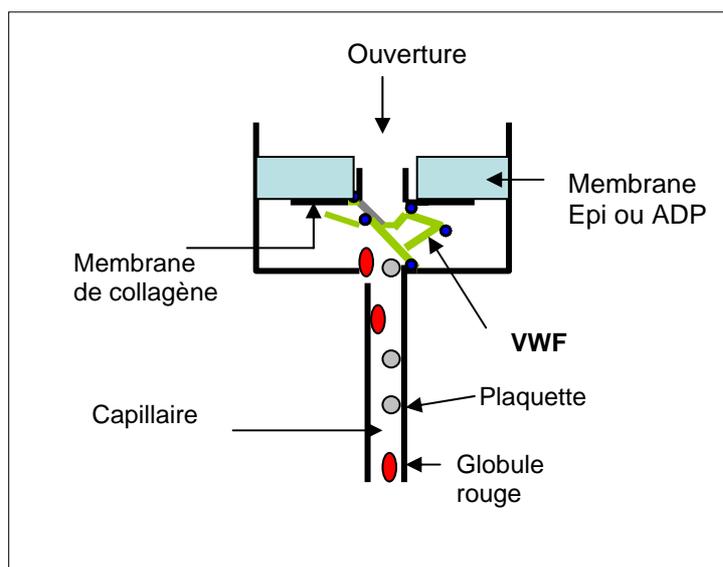
Ce test se fait sur automate PFA-100<sup>®</sup>, évalué pour la première fois, dans la pathologie constitutionnelle de l'hémostase, au laboratoire d'hémostase du CHU de Nantes. L'automate PFA-100<sup>®</sup> permet de réaliser *in vitro* une exploration globale de l'hémostase primaire à partir de sang total frais citraté (Fressinaud et al., 1998). Le principe consiste à simuler les conditions hémodynamiques rencontrées dans la microcirculation après une brèche vasculaire. Le système comprend une pompe à vide à haute résolution, contrôlée par un microprocesseur, et une cartouche test composée de (Figure 4):→Un réservoir: où se fait le dépôt de l'échantillon (800µl de sang total citraté).

→Un capillaire

→Une membrane de nitrocellulose

biologiquement active possédant un orifice central. Cette membrane est recouverte de collagène fibrillaire de type I (tendon de cheval) et d'un agoniste plaquettaire, soit de l'adrénaline (Epi), soit de l'Adénosine Diphosphate (ADP).

L'application d'une pression négative constante exercée par le PFA-100<sup>®</sup> aspire, par le capillaire, le sang du réservoir, qui passe ensuite par le trou de la membrane. Le capillaire reproduit la résistance hémodynamique d'une petite artériole. Les différents agonistes et les taux de cisaillement élevés induisent l'adhésion et l'agrégation des plaquettes conduisant à la formation d'un clou plaquettaire au niveau de l'orifice de la membrane. Le flux sanguin diminue progressivement jusqu'à l'arrêt total. Le temps nécessaire à l'arrêt de l'écoulement du sang, et donc à l'occlusion, est mesuré et défini comme le "temps d'occlusion" (TO).



**Figure 4:** Mécanisme de l'hémostase primaire dans la cartouche du PFA-100<sup>®</sup>. D'après Veyradier et al. 1998 (Veyradier et al., 1998).

La sensibilité de ce test est de l'ordre de 90%, ce qui le rend plus sensible que le temps de saignement (Favaloro, 2001; Fressinaud et al., 1998). Il est maintenant presque admis qu'un TO normal permet d'exclure une VWD. Un TO anormal conduit toujours à la réalisation de tests spécifiques du VWF, et si ces tests sont normaux, à l'exploration des fonctions plaquettaires (Fressinaud et Meyer, 2004). Il a donc un place de choix dans la stratégie diagnostique.

b) Les tests spécifiques:

Ils permettent de poser le diagnostic de VWD.

• L'antigène du VWF:(VWF:Ag)

Le dosage antigénique permet de quantifier le taux de VWF, sans tenir compte de l'activité fonctionnelle de la protéine. Les valeurs normales vont en moyenne de 50 à 150 UI/dl, l'interprétation du résultat tenant compte du groupe sanguin. En effet, les sujets de groupe sanguin O ont de manière physiologique un taux de VWF plus bas (seuil à 40 UI/dl) que les sujets de groupe sanguin non O (seuil à 60 UI/dl).

De nombreux tests de laboratoire existent, mais la technique de référence est l'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (**ELISA**) (Ingerslev, 1987); c'est une technique longue, nécessitant une nouvelle calibration pour chaque série et des incubations de plusieurs heures; elle n'est pas adaptée aux dosages unitaires ou à l'urgence.

Des techniques plus récentes semi-automatisées ont été décrites; il y a la technique VIDAS VWF (BioMerieux) qui utilise le principe **ELFA** (Enzyme-Linked Fluorecent Assay) et permet des dosages unitaires en 35 minutes (Pittet et al., 1997); et la technique d'immunoagglutination au latex, le STA-Liatest VWF, commercialisé par Diagnostica Stago. Cette technique est basée sur l'agglutination de microparticules de latex recouvertes d'anticorps polyclonaux spécifiques en présence du VWF du plasma, mesurée par turbidimétrie sur l'automate STA<sup>®</sup>; cette technique est rapide (huit minutes) et utilisable sur les automates de la gamme STA<sup>®</sup>: la corrélation avec la technique ELISA est excellente mais sa sensibilité est inférieure (6UI/dl contre 0,5 UI/dl) et il est noté une interférence avec de fortes concentrations en facteurs rhumatoïdes (Veyradier et al., 1999).

Les trois techniques ont des performances identiques pour des taux de VWF:Ag compris entre 5 et 120 UI/dl. Pour des taux inférieurs à 5%, seule la technique ELISA conventionnelle a une sensibilité suffisante.

- L'activité cofacteur de la ristocétine du VWF:(VWF:RCo)

La détermination du VWF:RCo est une mesure indirecte de l'affinité du VWF pour la GpIb plaquettaire; il teste la capacité du VWF à se lier aux plaquettes en présence de ristocétine qui reconnaît préférentiellement les multimères de haut poids moléculaire (HPM) et de poids moléculaire intermédiaire (IPM). Les valeurs normales sont les mêmes que pour le VWF:Ag (50 à 150 UI/dl) et sont également à interpréter en fonction du groupe sanguin.

La technique consiste à mesurer l'agglutination de plaquettes témoins, fixées, isolées du milieu plasmatique, en présence du plasma pauvre en plaquettes du patient et de concentrations croissantes de ristocétine (Macfarlane et al., 1975). La vitesse d'agrégation est inversement proportionnelle à la concentration de VWF. Elle dépend également de la répartition des multimères du VWF. Ce test est réalisable sur agrégomètre (Macfarlane et al., 1975) et sur automate STAR<sup>®</sup> Diagnostica STAGO (Miller et al., 2002). Il existe également une méthode semi-quantitative d'agglutination sur lame, cette technique rapide est utile en cas d'urgence (Wright et Krauss, 1990).

Un test ELISA a également été décrit (Murdock et al., 1997) et (Vanhoorelbeke et al., 2000), utilisant un anticorps monoclonal inhibant le site de liaison à la GpIb. Ce test semble avoir une forte sensibilité et une faible variabilité intra essai (Fressinaud et Meyer, 2004).

L'étude des rapports VWF:RCo et VWF:Ag est intéressante. Dans les déficits quantitatifs, il existe un parallélisme entre les taux de VWF:RCo et de VWF:Ag, et le rapport VWF:RCo/VWF:Ag est supérieur à 0,7 (comme chez les sujets normaux). Un taux notablement plus abaissé de VWF:RCo, oriente vers un déficit qualitatif où le rapport VWF:RCo/VWF:Ag est généralement inférieur à 0,7.

- Le FVIII:

Le dosage du **FVIII** doit être réalisé systématiquement dans le diagnostic de VWD. Le dosage de l'activité du FVIII (FVIII:C) se fait par mesure du temps de formation du caillot de fibrine en une ou deux étapes, ou par des techniques chromogéniques. Il faut savoir qu'il peut être dans les limites de la normale. Le FVIII:C est abaissé dans les déficits quantitatifs en VWF les plus sévères, et dans les variants moléculaires où le VWF ne peut pas lier le FVIII. Mais son dosage n'est pas suffisant pour porter le diagnostic de VWD ou l'éliminer: en effet, le FVIII:C peut être normal dans certains types 1 et 2, et un facteur FVIII:C abaissé peut être dû à une autre pathologie. Des tests plus spécifiques du VWF sont donc nécessaires.

c) Tests discriminants:

Ce sont souvent des tests spécialisés, en dehors de l'étude de l'agrégation plaquettaire en présence de ristocétine (RIPA).

➤ L'analyse des multimères:

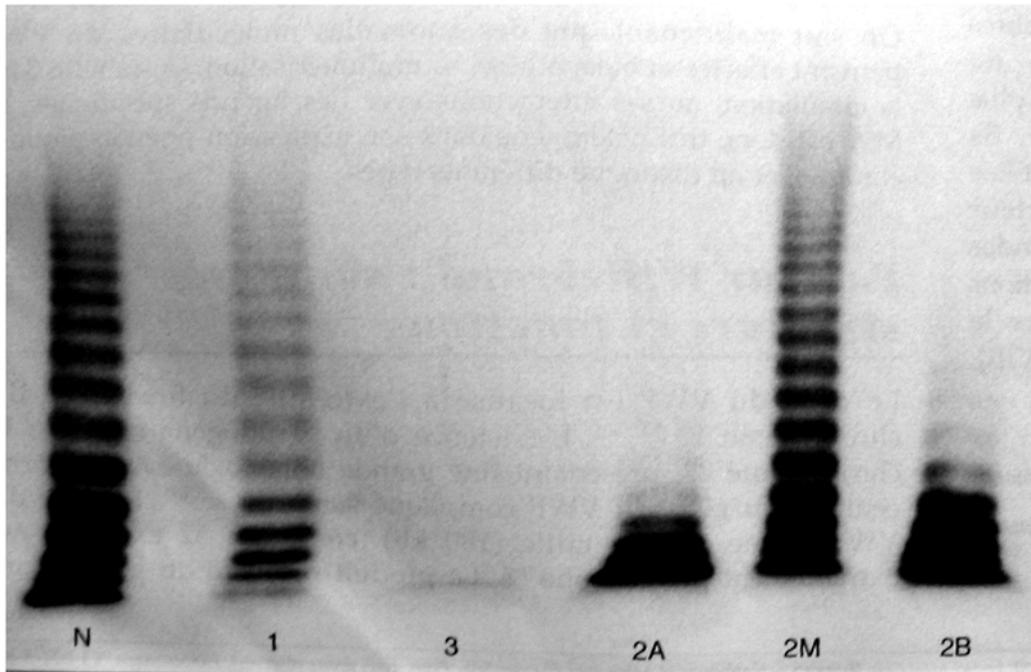
Cette technique consiste à séparer les multimères selon leurs poids moléculaires, en les faisant migrer par électrophorèse dans un gel d'agarose à faible concentration (Meyer et al., 1980). Le gel contient un agent dissociant fin de séparer les multimères qui sont ensuite révélés par autoradiographie avec un anticorps spécifique radiomarqué; plus récemment il a été proposé de modifier cette technique minutieuse, longue et nécessitant de recourir à la radioactivité. Les techniques d'immunoblotting peuvent être combinées à une détection colorimétrique (Miller et al., 1985) ou par luminescence (Schneppenheim et al., 1988) . Chaque multimère migre comme une bande (Cf figure 5).

Deux types de gels, selon la concentration d'agarose, sont utilisés:

1) les gels de faible résolution montrent trois types de profils dans la VWD: distribution normale, absence de multimères de haut poids moléculaires ou présence de multimères supra normaux.

2) les gels de haute résolution montrent différentes anomalies comme une modification d'intensité ou de position de la bande satellite de chaque multimère (Meyer et al., 2001).

C'est une technique longue et complexe, rarement mise en place dans les laboratoires d'hémostase. Elle est utile pour mieux typer une VWD, par exemple pour différencier certains variants moléculaires de type 2.



**Figure 5:** distribution des multimères du VWF dans le plasma. D'après E. Fressinaud et D. Meyer (Fressinaud et Meyer, 2001)

N: Plasma normal

1: Plasma de VWD de type 1: présence de tous les multimères mais en quantité moindre.

3: Plasma de VWD de type 3: pas de multimère détectable.

2A: Plasma de VWD de type 2A: absence des multimères de HPM et de IPM.

2M: Plasma de VWD de type 2M: présence de tous les multimères.

2B: Plasma de VWD de type 2B: absence des multimères de HPM.

➤ Analyse de la liaison du VWF au FVIII: (VWF:FVIII:B)

Elle permet de mettre en évidence un défaut de liaison du VWF du patient à du FVIII exogène, anomalie qualitative caractérisant le type 2N. Le VWF du patient est isolé par immunoadsorption, puis est mis en présence de FVIII exogène purifié. Le FVIII lié est ensuite mesuré par méthode chromogénique (Nishino et al., 1989), ou par ELISA (Caron et al., 2002). L'étude du VWF:FVIII:B doit être systématiquement réalisée chaque fois qu'il existe un déficit en FVIII avec un rapport FVIII:C/VWF:Ag anormal ( $<0,5$ ); en effet, seul ce test permet de distinguer le type 2N de VWD d'une hémophilie A.

➤ Agrégation des plaquettes induite par la ristocétine: (RIPA)

Elle teste la sensibilité à la ristocétine d'un plasma riche en plaquettes (PRP): la réponse dépend du taux et de la fonctionnalité du VWF. L'addition de ristocétine permet d'étudier l'interaction VWF-GpIb. Différentes concentrations de ristocétine (0 à 1,5 mg/ml) doivent être testées. Un **PRP normal** montre la présence d'agrégation jusqu'à une concentration en ristocétine de 1mg/ml. Dans le déficit quantitatif total, on n'obtient jamais d'agrégation quelque soit la concentration. Dans le déficit quantitatif partiel, la RIPA est peu sensible.

Dans les variants moléculaires avec diminution de l'affinité du VWF pour les plaquettes, la RIPA est nulle aux concentrations le plus élevées de ristocétine.

Dans le variant moléculaire avec augmentation de l'affinité du VWF pour les plaquettes, il existe une agrégation paradoxale pour de très faibles doses de ristocétine (0 à 0,8 mg/ml).

La RIPA n'est pas un test de première intention mais permet de confirmer ou de typer une VWD diagnostiquée sur des critères cliniques et les résultats d'autres tests quantitatifs et qualitatifs.

➤ Contenu plaquettaire en VWF:

Il consiste à faire des mesures de VWF:Ag et de VWF:RCo sur des lysats plaquettaires (Rodeghiero et al., 1990). Cette étude permet de différencier différents sous-types sur la base du contenu normal ou anormal de VWF dans les granules plaquettaires (Mannucci et al., 1985).

➤ Liaison du VWF plasmatique aux plaquettes:

*In vitro*, la liaison du VWF aux plaquettes peut être induite par la ristocétine ou la botrocétine. Cette étude est utile pour discriminer parmi les variants moléculaires, ceux qui ont une affinité diminuée pour la GpIb plaquettaire de ceux qui ont une affinité augmentée. D'autre part, les domaines du VWF impliqués sont différents, suivant que la liaison est induite par la ristocétine ou la botrocétine, ce qui permet également de discriminer des sous-types dans les variants avec affinité diminuée.

➤ Etude de la protéolyse du VWF:

Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe "Régularisation de la taille des multimères dans le plasma", le VWF est sensible à la protéolyse par la métalloprotéase ADAMTS13. On étudie donc le VWF après incubation avec cette métalloprotéase (Obert et al., 1999b). Le VWF provenant de patients du groupe O paraît plus sensible à la protéolyse (Bowen, 2003). Mais d'autres facteurs génétiques peuvent influencer la protéolyse.

➤ Dosage du propeptide:

Le propeptide reflète le taux de synthèse de VWF, sa mesure se fait par technique ELISA. Les taux de propeptide sont diminués parallèlement au VWF:Ag dans toutes les formes héréditaires de VWD, et restent normaux dans les formes acquises. On constate également que le taux de propeptide ne varie pas en fonction du groupe sanguin.

➤ Recherche d'anticorps anti-VWF:

Seuls les patients avec une VWD de type 3 peuvent développer des allo-anticorps anti-VWF après traitement substitutif, avec une prévalence estimée entre 7 et 10% (Mannucci et Cattaneo, 1991). Ces anticorps, pour la majorité, sont dirigés contre le site de liaison à la GpIb, et inhibent donc la RIPA et le VWF:RCo.

Dans le syndrome de Willebrand acquis (AVWS), des auto-anticorps anti-VWF peuvent être mis en évidence; ils peuvent avoir une activité anti-VWF:RCo ou être non inhibiteurs, mais induire une élimination rapide du complexe immunitaire formé (Mohri et al., 1998).

➤ L'analyse de l'ADN :

L'étude des anomalies génétiques des VWD de type 2 (Meyer et al., 2001) et de type 3 (Baronciani et al., 2000), ont été bien étudiées ces dernières années. Par contre l'étude génétique des VWD de type 1 reste peu documentée. La liste des polymorphismes et des mutations est constamment remise à jour et accessible sur internet: <http://www.sheffield.ac.uk/vwf>.

d) Difficultés diagnostiques:

➤ Le groupe sanguin:

L'interprétation des résultats doit prendre en compte le groupe sanguin ABO des patients. Les sujets de groupe O ont en effet un taux de VWF plus bas de 25 à 30 % par rapport aux sujets des autres groupes (Gill et al., 1987).

➤ Conditions pathologiques et physiologiques particulières:

Le sexe, l'âge, la grossesse, les oestrogènes et certains traitements sont connus pour modifier le taux de VWF, de façon provisoire pour certains. De même les situations d'inflammation aiguë ou chronique augmentent considérablement le taux de VWF et celui du FVIII. Inversement les sujets de type Caucasiens semblent avoir un taux de VWF significativement plus bas que celui des Afro-Américains.

➤ C'est pourquoi il est important de tenir compte du contexte clinique et des prises médicamenteuses concomitantes lors de l'interprétation des résultats et de répéter les prélèvements à distance.

**Devant l'hétérogénéité de la maladie et l'absence de test unique suffisamment sensible, le diagnostic de VWD doit toujours être corrélé à l'histoire clinique personnelle et familiale du patient, et confirmé par la répétition d'un panel d'examens de laboratoire en tenant compte des facteurs cités ci-dessus.**

### **3. Classification:**

Les différents déficits en VWF permettent de caractériser trois principaux groupes de VWD (Sadler, 1994).

#### a) Le type 1:

Il correspond à un déficit **quantitatif partiel** et constitue la forme la plus fréquente puisqu'il touche plus de **70%** des patients. La transmission est autosomique dominante mais avec une pénétrance variable. Le mécanisme du déficit n'est pas encore complètement élucidé. Il peut être dû à une anomalie de synthèse, de sécrétion ou de stabilité de la molécule.

On distingue plusieurs sous-types selon le contenu intra-plaquettaire en VWF (Mannucci et al., 1985), la réponse au traitement par la desmopressine pouvant alors être différente, bonne lorsque le contenu intra-plaquettaire est normal.

Dans ce type, les symptômes hémorragiques sont variables d'un sujet à l'autre.

Il a été suggéré que le niveau d'expression du récepteur  $\alpha_2 \beta_1$  pour le collagène à la surface des plaquettes pourrait constituer une explication aux différences de symptomatologie hémorragique chez les patients de type 1 ayant une diminution modérée de VWF. En effet les porteurs de l'allèle 807C sur le gène  $\alpha_2$  auraient une expression moindre du récepteur sur les plaquettes. Cette mutation est plus fréquemment retrouvée chez les VWD de type 1 que chez les sujets normaux (Di Paola et al., 1999). Les patients porteurs de cet allèle ont également un temps d'occlusion mesuré sur PFA-100<sup>®</sup> plus long. La biologie moléculaire de cette forme de la VWD reste mal connue. Une étude récente a montré la récurrence de la mutation Tyr1584Cys chez plusieurs patients de pays différents (O'Brien et al., 2003).

Son diagnostic a été récemment remis en cause par Sadler (Sadler, 2003). En effet selon cet auteur, l'association saignement et taux de VWF discrètement abaissé ne doit pas forcément

conduire au diagnostic de VWD. En effet ces déficits modérés en VWF ne seraient pas liés à une anomalie moléculaire au niveau du gène du VWF mais à divers facteurs extragéniques. Il existerait donc de nombreux "faux positifs", qui devraient faire partie d'une nouvelle catégorie : "taux de VWF abaissé". Cette nouvelle catégorie de patients serait à prendre en charge de manière différente, comme des personnes à risque et non comme des malades.

Toujours selon Sadler (Sadler, 2003), le diagnostic de VWD de type 1 repose sur l'association de saignements abondants et/ou fréquents, d'un taux notablement abaissé de VWF et sur la notion de transmission familiale.

b) Le type 3:

C'est la forme grave de la maladie, mais qui ne représente que **moins de 5%** des cas de VWD. Il est du à une anomalie quantitative, mais contrairement au type 1, le **déficit en VWF est total**. Le taux de VWF est indétectable dans le plasma et dans les plaquettes. L'absence de VWF entraîne un déficit profond en FVIII de l'ordre de 1 à 10 UI/dl; c'est pourquoi les patients, outre la symptomatologie cutanéomuqueuse, ont une symptomatologie identique à celle de l'hémophile A avec des hémorragies et des hémarthroses.

Le mode de transmission est récessif, les sujets étant homozygotes ou hétérozygotes composites.

Les anomalies moléculaires sont de plusieurs sortes : délétions prédisposant les patients à la formation d'allo-anticorps, mutations non-sens, défaut d'épissage. Il existe donc une grande hétérogénéité des anomalies moléculaires retrouvées, avec un grand nombre de mutations décrites (Baronciani et al., 2000).

Le développement d'allo-anticorps anti-VWF est une complication redoutable, rendant inefficace le traitement par concentrés de VWF (Mannucci et al., 1981).

c) Le type 2:

Il définit les variants de la maladie caractérisés par l'existence d'un VWF qualitativement anormal ; il en existe quatre grands sous-types. Contrairement au type 1 dont le génotype est très peu documenté, l'analyse du gène du VWF (Mancuso et al., 1989) a permis d'associer ces variants à différentes anomalies moléculaires (<http://www.sheffield.ac.uk/vwf>) .

i. Type 2A:

Le type 2A est le premier variant moléculaire identifié dans la littérature avec une diminution de l'affinité du VWF pour les plaquettes liée à l'absence des multimères de HPM. Il existe en fait quatre sous-types: IIA, IIC, IID et IIE, le sous-type IIA étant de loin le plus fréquent. Pour les patients avec le sous-type IIA de transmission dominante, les mutations sont localisées au niveau du domaine A2 qui contient le site de protéolyse physiologique de la molécule (a.a. 1605-1606). Les mutations les plus souvent retrouvées sont : R1597W et I1628T (Sadler et al., 2000). Dans le sous-type IIA, deux types de mécanismes ont été individualisés: une sensibilité à la protéase ADAMTS13 augmentée, ou un transport intra-cellulaire anormal.

Pour les très rares patients avec les sous-types IIC et IID dont la transmission est récessive, l'anomalie moléculaire est située au niveau du domaine D2 (sous-type IIC) entraînant une absence de multimérisation, ou au niveau du domaine CK (sous-type IID) entraînant une dimérisation anormale. Le dernier sous-type IIE est différent car la répartition des multimères du VWF est peu anormale et il peut être aisément confondu avec un type 1; les anomalies moléculaires responsables sont situées dans le domaine D3 et entraînent une rétention intra-cellulaire du VWF.

ii. Type 2B:

Les variants de **type 2B** sont caractérisés par une augmentation de l'affinité du VWF pour la GpIb plaquettaire. Les anomalies moléculaires responsables sont situées au niveau du domaine A1. Elles modifient la conformation du VWF en augmentant l'accessibilité de son site de liaison à la GpIb. La structure multimérique du VWF est toujours normale dans les plaquettes alors qu'il existe dans le plasma le plus souvent une absence des multimères de HPM, liée à leur adsorption sur les plaquettes, pouvant entraîner une thrombopénie; il ne reste plus alors en circulation que les formes de bas poids moléculaire qui ont une action hémostatique moins importante. Quatre anomalies moléculaires sont fréquentes: R1306W, R1308C, V1316M et R1341Q (Meyer et al., 2001).

iii. Type 2M:

Les variants de **type 2M** (M pour multimères) sont caractérisés par une diminution de la liaison du VWF aux plaquettes, non liée à la perte des multimères de HPM. Ils sont associés à des mutations du domaine A1.

Décrit initialement comme rare, ce variant est en fait fréquent. Il est finalement lui aussi hétérogène. L'étude INSERM Française coordonnée par le Professeur D. Meyer (Unité 143) a

montré qu'il y avait deux grands sous-groupes; des patients avec un phénotype typique où le VWF a une structure multimérique strictement normale et une liaison à la GpIb diminuée en présence de ristocétine mais normale en présence de botrocétine, et des patients "2A-like" avec un phénotype atypique où le VWF a une structure multimérique anormale et une liaison à la GpIb diminuée à la fois en présence de ristocétine et de botrocétine (Ribba et al., 2001). Les phénotypes atypiques sont les plus fréquents, identifiés chez 55% des patients dans l'étude française. La caractérisation des VWF recombinants mutés a permis de préciser les mécanismes: les anomalies moléculaires altèrent soit le site de liaison à la GpIb (phénotype 2M "typique"), soit la conformation du domaine A1 et le processus de multimérisation du VWF, modifiant ainsi sa capacité à se lier à la GpIb (phénotype 2M "atypique"). Un variant particulier "2M Vicenza" est actuellement classé dans le type 2M. Chez ces patients, on retrouve des multimères de très haut poids moléculaire (THPM) dans le plasma non retrouvés dans un plasma normal, et un VWF antigène et activité très bas. Tous les patients partagent la mutation du même a.a. du domaine D3 (R1205) (Schneppenheim et al., 2000). En fait le VWF ne présente pas d'anomalie fonctionnelle mais une clairance augmentée en faveur non d'un type 2, mais plutôt d'un type 1 de VWD.

iv. Type 2N:

Le variant "Normandie" (**type 2N**) correspond à un défaut de liaison du VWF au FVIII. Les mutations ont été mises en évidence dans les domaines D' (et D3). La distribution de multimères est normale ainsi que les fonctions plaquettaires. Seul le VWF:FVIIIIB permet de le distinguer d'une hémophilie A.

**Tableau 1:** Mécanismes physiopathologiques des variants moléculaires de la VWD d'après le rapport de l'étude INSERM coordonnée par le Professeur D. Meyer.

Sous-type	Domaine du VWF	Mécanismes
<b>2N</b>	D' et D3	Liaison au FVIII diminuée
<b>2B</b>	A1	Liaison à la Gplb augmentée
<b>2M</b>	A1	Liaison à la Gplb diminuée
<b>2A (IIA)</b>	A2	Sensibilité à la protéase ADAMTS13 augmentée ou transport intracellulaire anormal
<b>2A (IIC)</b>	D2	Absence de multimérisation
<b>2A (IID)</b>	CK	Dimérisation anormale
<b>2A (IIE)</b>	D3	Multimérisation anormale et rétention intracellulaire
<b>Vicenza</b>	D3	Clairance augmentée

**Tableau 2:** Résultats des tests biologiques courants

VWD	Temps de saignement	Temps d'occlusion sur PFA-100®	FVIII:C	VWF:Ag	VWF:RCo	VWF:RCo/VWF:Ag
<b>type 1</b>	N ou allongé	allongé	N ou diminué	diminué	diminué	>0,7
<b>type 2A</b>	allongé	allongé	N ou diminué	N ou diminué	très diminué	<0,7
<b>type 2B</b>	allongé	allongé	N ou diminué	N ou diminué	très diminué	<0,7
<b>type 2M</b>	allongé	allongé	N ou diminué	N ou diminué	diminué	<0,7
<b>type 2N</b>	N	N	Très diminué	N ou diminué	N ou diminué	>0,7
<b>type 3</b>	très allongé	allongé	Très diminué	nul	nul	-

N= Normal

**Tableau 3:** Résultats des tests biologiques spécialisés dans les différents types de VWD d'après Fressinaud et al. (Fressinaud et Meyer, 2004).

	VWD de type 1	VWD de type 2A	VWD de type 2B	VWD de type 2M	VWD de type 2M "Vicenza"	VWD de type 2N	VWD de type 3
<b>VWF:FVIII</b>	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Diminué	–
<b>Multimères plasmatiques</b>	Normaux	Perte des HPM et IPM	Perte des HPM	Normaux (ou discrète diminution des HPM)	Présence de THPM	Normaux ou rarement perte des HPM	Indétectables
<b>Multimères plaquettaires</b>	Normaux	Normaux ou perte des HPM et IPM	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux	Indétectables
<b>RIPA</b>	Normale ou diminuée	Diminuée ou nulle	Agrégation paradoxale à faibles doses	Diminuée ou nulle	Normale	Normale	Nulle
<b>Liaison du VWF aux plaquettes en présence de ristocétine</b>	Normale	Diminuée	Agrégation paradoxale à faibles doses	Diminuée	Normale	Normale	Non réalisable
<b>Liaison du VWF aux plaquettes en présence de botrocétine</b>	Normale	Diminuée	Agrégation paradoxale à faibles doses	Normale ou diminuée	Normale	Normale	Non réalisable

#### **4. Diagnostics différentiels:**

##### a) Le sujet normal:

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux facteurs pathologiques (inflammation) ou physiologiques (groupe sanguin, grossesse) peuvent modifier modérément le taux de VWF. Mais il faut noter également une grande dispersion de la zone normale du taux de VWF plasmatique (Fressinaud et Meyer, 2001).

##### b) Le syndrome de Willebrand acquis:

Contrairement à la VWD constitutionnelle, le AVWS est une entité rare, mais sa prévalence est vraisemblablement sous-estimée.

Le développement d'un AVWS est souvent concomitant d'une maladie sous-jacente, et survient en général chez les sujets de plus de 60 ans. Le plus souvent cette maladie est un syndrome lymphoprolifératif (Hamidou et al., 1997) : en effet un tiers des AVWS sont des gammopathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS) (Federici et al., 1998). Une cause également souvent retrouvée de AVWS est le rétrécissement aortique (RAo) (Vincentelli et al., 2003). Mais il peut également s'agir d'une néoplasie, d'un désordre auto-immun, d'une infection, d'une prise médicamenteuse... (Veyradier et al., 2000).

Différents mécanismes pathogéniques sont proposés. Il peut s'agir d'un défaut de synthèse ou de libération du VWF par les cellules endothéliales, d'une protéolyse anormale du VWF, de son adsorption sur des cellules tumorales, d'une clairance accélérée des multimères de HPM au niveau de valves ou d'artères sténosées, ou de la présence d'auto-anticorps dirigés contre le VWF (Veyradier et al., 2000). Le diagnostic doit être évoqué devant l'absence d'antécédents personnels et familiaux de VWD, la découverte d'une affection immunopathologique associée et la disparition du syndrome après traitement de cette affection (Fressinaud et Meyer, 2001). Un auto-anticorps peut également être mis en évidence, il peut être dirigé contre le VWF:RCo, ou être non inhibiteur et il est alors mis en évidence par technique ELISA indirecte (Stewart et al., 1997).

La mesure du temps d'occlusion sur automate PFA-100<sup>®</sup>, du VWF:Ag et du VWF:RCo, permettent d'évoquer le diagnostic. Les anomalies biologiques sont celles d'une VWD de type 1 ou le plus souvent de type 2 (Fressinaud et Meyer, 1995).

En cas d'AVWS lié à une MGUS, la stratégie thérapeutique peut faire appel à la desmopressine, aux gammaglobulines intraveineuses ou à l'injection de concentrés de VWF dont la demi-vie peut être très raccourcie (Federici et al., 1998).

Dans le cas d'un AVWS sur pathologie d'une valve cardiaque, l'anomalie est corrigée après traitement chirurgical (Vincentelli et al., 2003).

c) La pseudo-VWD:

La pseudo-VWD, de transmission autosomale dominante est une thrombopathie où il existe une augmentation de l'affinité de la GpIb pour le VWF. Les multimères de HPM se lient à la GpIb anormale, ce qui induit leur disparition du plasma et une thrombopénie modérée comme dans le type 2B de la VWD (Weiss et al., 1982). Pour faire la distinction entre ces deux pathologies, il faut réaliser des épreuves croisées en test d'agrégation plaquettaire ou de liaison du VWF aux plaquettes en présence de ristocétine. En cas de pseudo-maladie de Willebrand, la liaison du VWF du plasma du patient à des plaquettes témoins n'est pas augmentée, comme c'est le cas dans la VWD de type 2B. A l'inverse, la liaison du VWF d'un plasma témoin est augmentée en présence des plaquettes du malade.

Deux mutations au niveau de la sous-unité de la GpIb ont été décrites chez les patients atteints de pseudo-VWD (Miller et al., 1991; Russell et Roth, 1993).

La distinction est importante du point de vue thérapeutique puisque la desmopressine ou les concentrés de VWF sont contre-indiqués, pouvant induire une thrombopénie. Ces patients devraient donc plutôt être traités par des concentrés plaquettaires (Fressinaud et Meyer, 2001).

d) Hémophilie A:

La distinction est parfois difficile à faire avec les variants de VWD de type 2N. Lorsque le FVIII:C est inférieur à 3UI/dl, on s'oriente très probablement vers une hémophilie A. Par contre pour un taux entre 3 et 35UI/dl, les deux diagnostics doivent être envisagés et seules la transmission génétique (liée au sexe dans l'hémophilie A et autosomique dans la VWD 2N) et surtout l'étude de la liaison du VWF au FVIII (VWF:FVIIIIB) permettent de faire le diagnostic.

## 5. Traitement:

Le but du traitement est de corriger les troubles de l'hémostase primaire et les troubles de la coagulation (Fressinaud et Meyer, 2001). Il existe deux produits utilisés pour arrêter le saignement et prévenir le saignement per-opératoire: la desmopressine, et les concentrés plasmatiques de VWF et de FVIII. Le choix dépend du type de VWD, de la réponse à la desmopressine et de la situation clinique.

Des traitements locaux, dépendant du lieu du saignement, peuvent être utilisés et s'avèrent souvent suffisants: compression locale, méchage résorbable d'une épistaxis, utilisation d'une colle biologique après avulsion dentaire, traitement hormonal en cas de ménorragies, etc...

L'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens doivent être formellement proscrits. D'autres traitements sont utilisés comme les concentrés plaquettaires et les inhibiteurs synthétiques de la fibrinolyse (acide tranexamique), dans les saignements muqueux ou les ménorragies.

Il n'est pas encore clairement défini quel paramètre est le mieux corrélé au risque de saignement et à l'efficacité thérapeutique : le taux de FVIII:C ou le taux de VWF ; mais il a été bien démontré que dans les hémorragies des muqueuses, la correction du déficit en VWF et si possible la correction de l'allongement du temps de saignement, est importante.

### a) La desmopressine ou deamino-8-D-arginine (dDAVP):

C'est un analogue synthétique de la vasopressine, utilisé initialement dans le traitement du diabète insipide, commercialisé sous le nom de MINIRIN<sup>®</sup> pour la forme intraveineuse (IV), et OCTIM<sup>®</sup> pour le spray nasal.

Le premier essai clinique sur les patients atteints de VWD et les hémophiles A mineurs date de 1977 (Mannucci et al., 1977) : il avait pour but d'éviter chez ces patients les transfusions de produits dérivés du sang.

➤ **Mode d'action:** la desmopressine a pour propriété de mobiliser le FVIII et le VWF depuis leurs sites de stockage intracellulaires vers le plasma. Les sites de stockage sont les corps de Weibel-Palade pour le VWF, et restent inconnus pour le FVIII (Hashemi et al., 1993). Pour qu'elle soit efficace, il faut un contenu intracellulaire en VWF normal, quantitativement et qualitativement.

➤ **Mode d'administration:**

- **MINIRIN<sup>®</sup>**: par perfusion intraveineuse à la dose de 0,3µg/kg dans 50 ml de sérum physiologique pendant 30 minutes. En 30 minutes, les taux de FVIII et de VWF augmentent de 3 à 5 fois par rapport à leur valeur de base. Le pic de réponse survient 30 minutes après la fin de l'injection. Les perfusions peuvent être répétées toutes les 12 à 24 heures.
- **OCTIM<sup>®</sup>**: spray pour administration nasale, avec un pic de réponse à 1 heure (Mannucci et Federici, 2001) (Mannucci, 2001).

➤ **Effets indésirables:** ils sont à type de maux de tête, tachycardie, flush, liés aux effets vasomoteurs de la desmopressine. On retrouve rarement des cas d'hyponatrémie ou de surcharge hydrique, liés à l'effet anti-diurétique de la vasopressine, et survenant surtout si la restriction hydrique n'est pas instituée pendant toute la durée du traitement (Mannucci et Federici, 2001).

Plus graves, mais extrêmement rares, sont les manifestations vasculaires à type de thrombose (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral), liées à l'apparition transitoire dans le plasma de formes ultra larges de multimères provenant des cellules endothéliales. Ces formes accélèrent le phénomène d'agrégation plaquettaire en cas de flux sanguin rapide comme dans les artères sténosées (Mannucci, 2001). Ce traitement est donc déconseillé chez les sujets âgés ou présentant des facteurs de risque vasculaire.

➤ **Avantages:** ce traitement est peu coûteux et ne présente aucun risque de transmission de maladie infectieuse (Mannucci, 2001).

➤ **Inconvénient:** une tachyphylaxie se produit dès la deuxième ou troisième injection (Mannucci et Federici, 2001).

➤ **Réponse au traitement:** les différents types de VWD répondent différemment au traitement. Classiquement il est admis que dans le type 1, la réponse est bonne, avec une correction du FVIII:C, du VWF et du temps de saignement dans les 30 minutes et pendant 6 à 8 heures. Dans le type 2A et le type 2M, la réponse est variable; dans le type 2N, le FVIII:C augmente mais la réponse est très brève. La desmopressine n'est pas utilisée dans le type 3 car il n'y a pas de VWF mobilisable, et elle est classiquement contre-indiquée dans le type 2B du fait du risque de thrombopénie transitoire (Mannucci et Federici, 2001).

Le suivi du TO mesuré par le PFA-100<sup>®</sup> après administration de desmopressine est un bon marqueur d'efficacité thérapeutique (sauf dans le type 2N). Sa correction semble corrélée à la mise en circulation des multimères de HPM ; une forte association entre ces deux paramètres

a été démontrée par Favaloro et al. en 2001 (Favaloro et al., 2001a). Ce test est associé aux dosages du FVIII, du VWF:RCo et du VWF:Ag.

Les critères de bonne réponse retenus sont: l'augmentation du VWF:RCo et du FVIII:C à trois fois la valeur de base à la fin de la perfusion de MINIRIN<sup>®</sup>, avec des taux finaux d'au moins 30 UI/dl; et un temps de saignement inférieur ou égal à 12 minutes (Federici et al., 2003).

**Tableau 4:** Efficacité de la desmopressine dans les différents types de VWD. D'après E. Fressinaud et al. (Fressinaud et Meyer, 2001).

<b>Type</b>	<b>Desmopressine</b>
<b>1</b>	Habituellement efficace
<b>2A</b>	Efficacité variable
<b>2B</b>	Généralement contre-indiquée
<b>2M</b>	Efficacité variable
<b>2N</b>	Efficace mais réponse très brève
<b>3</b>	Inefficace

b) Les concentrés plasmatiques de VWF:

Ces produits, efficaces dans tous les types de VWD, sont réservés aux patients ne pouvant bénéficier d'un traitement par la desmopressine du fait d'une inefficacité, d'une contre-indication ou d'une tachyphylaxie. Il existe deux types de concentrés disponibles en France : WILSTART<sup>®</sup> (LFB), qui contient environ moitié moins de FVIII que de VWF; et le WILFACTIN<sup>®</sup> (LFB) qui ne contient pratiquement pas de FVIII. Ces produits subissent trois étapes de sécurisation: une étape solvant-détergent, puis une nanofiltration à 35 nm, enfin un chauffage à sec.

En cas d'urgence et de FVIII:C très abaissé, le WILSTART<sup>®</sup> doit être utilisé. En cas d'acte chirurgical programmé, le traitement peut-être commencé 12 à 24 heures avant: le VWF transfusé permet la stabilisation et la protection du FVIII endogène synthétisé par le patient, permettant alors d'utiliser du VWF dépourvu de FVIII (Fressinaud et Meyer, 2001). En cas d'échec ou d'impossibilité de maîtriser un syndrome hémorragique chez un patient avec

VWD de type 3, il a été proposé d'associer aux concentrés plasmatiques l'injection de desmopressine (Cattaneo et al., 1989) ou de concentrés plaquettaires (Castillo et al., 1991).

c) Traitement au cours de la grossesse:

La grossesse augmente les taux de VWF et de FVIII à partir de la 10<sup>ième</sup> à la 11<sup>ième</sup> semaine d'aménorrhée, sauf chez les femmes atteintes d'une VWD de type 3, qui gardent un taux de VWF et de FVIII indétectables. Cependant dans le type 2, l'anomalie qualitative persiste.

Une surveillance régulière au cours de la grossesse est indispensable. Cette surveillance doit être très rigoureuse dans les semaines suivant l'accouchement, car le taux de VWF chute très rapidement et le risque de saignement augmente.

Les patientes atteintes de VWD de type 2B aggravent leur thrombopénie en cours de grossesse (Mannucci et Federici, 2001).

d) Traitement des VWD de type 3 avec allo-anticorps:

Les allo-anticorps anti-VWF se développent chez 10 à 15% des patients atteints de VWD de type 3. Les perfusions de concentré de VWF deviennent donc inefficaces et à risque de créer une réaction transfusionnelle liée à la nature de l'anticorps. Le traitement le plus adapté est donc le FVIII recombinant qui ne contient pas de VWF, et n'induit pas de risque de formation de complexes immuns; l'administration est réalisée en intra veineux continu du fait de la demi-vie courte du FVIII en l'absence de VWF (Mannucci, 2001).

## **6. Le diagnostic prénatal:**

Le diagnostic prénatal n'est à envisager que chez les couples ayant donné naissance à un enfant atteint de VWD de type 3 (Peake et al., 1990). La technique utilisée repose sur l'analyse de l'ADN du tissu fœtal, obtenu par biopsie de trophoblaste après la dixième semaine de gestation. Lorsque la ou les mutations ne sont pas connues, différents polymorphismes du gène du VWF sont étudiés pour repérer les allèles mutés (Fressinaud et Meyer, 2001).

## **OBJECTIF DE L'ETUDE**

Les tests qui sont aujourd'hui couramment réalisés, dans l'ensemble des laboratoires, pour le diagnostic et le typage de la VWD sont: le VWF:Ag, le VWF:RCO, le FVIII:C et la mesure du temps d'occlusion sur PFA-100<sup>®</sup>. L'intérêt et la place de l'étude de la capacité de liaison du VWF au collagène (VWF:CB) dans le diagnostic et la classification de VWD, ne sont toujours pas clairement démontrés dans la littérature. Dans ce contexte, nous nous posons plusieurs questions:

→ Le VWF:CB a-t-il sa place dans le diagnostic de la VWD? Ce test fonctionnel décrit plus récemment, basé sur la capacité de liaison du VWF au collagène peut-il remplacer, comme l'a proposé Favaloro, le VWF:RCO, qui est le test fonctionnel le plus utilisé actuellement (Favaloro, 2002a)?

→ Est-ce que le VWF:CB permet d'améliorer le typage de la VWD? C'est-à-dire, permet-il de mieux discriminer une anomalie quantitative d'une anomalie qualitative?

→ Parmi les variants moléculaires existants, ce test nous permet-il de mieux distinguer ceux chez lesquels il existe une anomalie de la répartition des multimères (types 2A et 2B)?

→ Est-ce que ce test ne permettrait pas de remplacer l'étude de la répartition des multimères du VWF, test très lourd techniquement, nécessitant le recours à la radioactivité ?

→ Et finalement, ne serait-il pas le meilleur test pour dépister certains AVWS, où il peut n'exister qu'une disparition des multimères de HPM?

Dans ce but, nous avons mis au point la technique d'étude du VWF:CB, telle qu'elle a été décrite originellement (Favaloro et al., 1991). Pour cela nous avons utilisé deux types de collagènes, le collagène HORM commercialisé par NYCOMED et composé à 95% de collagène de type I et à 5% de collagène de type III; et du collagène de type III extrait de placenta humain, commercialisé par SIGMA. Un dosage de VWF:CB a été réalisé avec les deux types de collagènes chez un groupe de 20 sujets sains, et chez 49 patients suivis au Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie de Nantes pour une VWD de type constitutionnelle ou acquise. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux des tests actuellement utilisés en routine au laboratoire d'hémostase pour diagnostiquer et classer une VWD.

## **MATERIEL ET METHODE**

### **1. Populations:**

Le sang veineux a été recueilli sur tubes citratés (1 volume de citrate de sodium 3,2% pour 9 volumes de sang) pour les tests d'hémostase. Le plasma pauvre en plaquette a été obtenu après double centrifugation à 3500 g pendant 15 mn, puis aliquoté et conservé à moins 80°C jusqu'au dosage (Favaloro et al., 2001b).

#### a) Sujets témoins:

20 volontaires sains: 13 femmes et 7 hommes, ont servi de contrôles. Aucun n'avait d'antécédent hémorragique et toute prise médicamenteuse avait été exclue depuis au moins deux semaines.

L'âge des sujets témoins va de 21 à 58 ans, avec une moyenne d'âge de 34 ans.

La mesure du TO sur automate PFA-100<sup>®</sup> a été réalisée chez 16 sujets sur 20 (PFA-100<sup>®</sup> Epi: N<170 secondes ; PFA-100<sup>®</sup> ADP : N <110 secondes).

Les valeurs de plaquettes ont été mesurées

Le valeurs de VWF:Ag et de VWF:RCo ont été interprétées comme normales en fonction du groupe sanguin des sujets (N >40 UI/dl pour les sujets de groupe O; N> 60 UI/dl pour les sujets de groupe non O).

Les résultats sont reportés dans le tableau 5.

**Tableau 5:** Résultats chez les sujets témoins.

N°	Plaq. (10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup> )	PFA Epi (sec.)	PFA ADP (sec.)	FVIII:C (UI/dl)	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:RCo/ VWF:Ag
1	250	156	88	147	105	84	0,8
2	228	100	76	99	87	77	0,89
3	163	142	105	90	96	76	0,79
4	220	127	98	122	89	83	0,93
5	161	126	93	106	68	69	1,01
6	337	154	93	102	47	54	1,15
7	225	ND	ND	106	138	146	1,06
8	164	109	79	119	104	101	0,97
9	247	181	101	84	66	68	1,03
10	218	110	86	135	107	117	1,09
11	276	ND	ND	108	108	123	1,14
12	181	109	71	130	119	126	1,06
13	267	ND	ND	165	100	113	1,13
14	283	153	90	82	86	76	0,88
15	221	137	98	80	61	57	0,93
16	186	188	86	113	88	98	1,11
17	280	127	81	116	74	69	0,93
18	250	122	85	96	81	88	1,09
19	261	168	105	77	52	55	1,06
20	226	ND	ND	95	60	47	0,78
<b>Moyenne + ET</b>	-	-	-	<b>108,6 + 23,1</b>	<b>86,8 + 22,3</b>	<b>83 + 27,3</b>	<b>1 + 0,11</b>
<b>Médiane</b>	-	-	-	<b>106</b>	<b>87,5</b>	<b>76,5</b>	<b>0,79</b>

ND = non déterminé

ET= Ecart-type

b) Patients atteints de VWD:

Les patients inclus dans cette étude sont régulièrement suivis au Centre de Traitement de l'Hémophilie du CHU de Nantes, où le diagnostic de VWD a été posé.

Nous avons étudié les plasmas de 49 patients atteints de différents types de VWD. Le groupe se composait de 30 femmes et 19 hommes âgés de 4 à 80 ans (âge moyen 29 ans). Parmi ces patients, 43 sont atteints d'une VWD congénitale et 6 d'un AVWS.

La répartition des patients est représentée dans le tableau 6.

**Tableau 6:** Répartition des patients atteints de VWD dans notre étude.

	VWD	Nombre de patients	Nombre de familles
<b>Constitutionnelle</b>	Type 1	16	16
	Type 2A	9	5
	Type 2B	9	6
	Type 2M	8	6
	Type 3	1	1
<b>Acquise</b>	MGUS	3	-
	RAo	3	-

Le diagnostic de VWD avait été antérieurement posé sur une histoire clinique personnelle et/ou familiale de troubles hémorragiques et sur le phénotype biologique établi à partir de différents tests de laboratoire (FVIII:C, VWF:Ag, VWF:RCo, agrégation plaquettaire induite par la ristocétine, étude de la distribution des multimères du VWF pour certains patients).

La classification s'est appuyée sur la détermination du rapport VWF:RCo/VWF:Ag. Si les taux de VWF:Ag et de VWF:RCo sont proportionnellement diminués, le rapport VWF:RCo/VWF:Ag est  $> 0,7$ , ce qui est faveur d'un déficit quantitatif (type 1) (tableau 7).

S'il existe une dissociation activité/antigène, le rapport VWF:RCo/VWF:Ag est  $< 0,7$ , ce qui est faveur d'une VWD de type 2. Des explorations complémentaires sont nécessaires. Une étude de RIPA est réalisée, à la recherche d'agrégation à de faibles doses de ristocétine, qui est en faveur d'une VWD de type 2B (tableau 8). Seule l'étude de la répartition des multimères permet de distinguer un type 2A d'un type 2M (tableaux 9 et 10).

Pour certains de nos patients, l'analyse moléculaire du gène du VWF a été effectuée dans le cadre du réseau INSERM coordonné par le Professeur D. Meyer.

Les patients d'une même famille portent le même numéro initial (exemple: 19.1 et 19.2 sont deux patients d'une même famille).

Les patients avec AVWS sont actuellement dépistés par une histoire clinique retrouvant des manifestations hémorragiques récentes, sans antécédents personnels ou familiaux, et/ou sur la notion d'un allongement du TO sur PFA-100<sup>®</sup> (tableaux 11A et 11B).

Les résultats des paramètres ayant conduit au diagnostic de VWD sont résumés dans les tableaux suivants.

**Tableau 7:** Résultats chez les patients avec VWD de type 1

N°	Plaq. (10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup> )	PFA Epi (sec.)	PFA ADP (sec.)	FVIII:C (UI/dl)	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:RCo/ VWF:Ag
1	272	>300	204	63	20	18	0,90
2	209	>300	>300	34	8	10	1,25
3	326	>250	>250	62	46	33	0,70
4	243	252	172	57	22	24	1,00
5	203	225	175	54	28	26	0,90
6	273	214	148	84	42	33	0,80
7	280	235	165	20	26	30	1,20
8	251	240	128	61	40	40	1,00
9	254	>300	221	63	27	23	0,90
10	269	>250	188	80	42	34	0,80
11	150	171	180	45	32	38	1,20
12	249	156	136	60	30	37	1,20
13	372	>300	>200	95	27	22	0,80
14	268	159	127	68	33	35	1,00
15	267	>300	173	53	26	29	1,10
16	264	>300	216	81	26	24	0,90
<b>Moyenne ± ET</b>	- -	- -	- -	<b>61 ± 18,8</b>	<b>30 ± 6,8</b>	<b>28,5 ± 8,1</b>	<b>1 ± 0,16</b>

Ainsi chez tous ces patients, le rapport VWF:RCo/VWF:Ag est supérieur à 0,7 et aucun ne présente d'agrégation en présence de ristocétine faible dose.

**Tableau 8:** Résultats chez les patients avec VWD de type 2B

	N°	Plaq. (10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup> )	PFA Epi (sec.)	PFA ADP (sec.)	FVIII:C (UI/dl)	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:RCo /VWF:Ag	Multimères du VWF	Mutation (exon 28 du gène du VWF)
Famille A	17	170	>300	>300	54	47	20	0,43	Absence des HPM et IPM	R1306W
Famille B	18	117	ND	ND	68	39	29	0,74	ND	ND
Famille C	19.1	202	ND	ND	31	28	14	0,5	Distribution normale	R1341W
	19.2	170	>300	>300	35	29	16	0,55	ND	ND
Famille D	20	201	>300	>300	32	31	14	0,45	Absence des HPM	R1341Q
Famille E	21.1	227	>300	>246	45	43	35	0,81	Distribution normale	ND
	21.2	191	>300	>300	40	32	21	0,66	ND	ND
Famille F	22.1	140	ND	ND	60	55	20	0,36	ND	R1308C
	22.2	165	>300	>300	48	32	12	0,38	Absence des HPM	R1308C
	<b>Moyenne ± ET</b>	- -	-	-	<b>46,0 ± 12,9</b>	<b>38 ± 9,3</b>	<b>20 ± 7,6</b>	<b>0,54 ± 0,17</b>	-	-

Le chiffre des plaquettes chez nos patients ne met pas en évidence de thrombopénie.

Tous les patients présentaient une RIPA augmentée à des concentrations de ritocétine de 0,2 à 0,6 mg/ml.

Deux patients (18 et 21.1) ont un rapport VWF:RCo/VWF:Ag >0,7, qui aurait pu faire méconnaître le type 2B, mais l'épreuve de RIPA à faible dose de ristocétine orientait bien vers une VWD de type 2B.

Dans 4 familles (A, C, D et F), une mutation typique du type 2B était retrouvée au niveau du domaine A1 du VWF.

**Tableau 9:** Résultats chez les patients avec VWD de type 2A

	N°	Plaq. (10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup> )	PFA Epi (sec.)	PFA ADP (sec.)	FVIII:C (UI/dl)	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:RCo/ VWF:Ag	Mutation (exon 28 du gène du VWF)
Famille G	23	151	>300	>300	49	31	9	0,29	ND
Famille H	24.1	288	>300	>300	82	67	30	0,45	S1506L
	24.2	312	>300	>300	77	87	36	0,41	ND
	24.3	255	>300	>300	43	48	19	0,40	ND
	24.4	312	>300	258	64	67	33	0,49	ND
Famille I	25.1	244	ND	ND	27	25	5	0,20	S1506L
	25.2	233	ND	ND	25	26	8	0,31	ND
Famille J	26	294	>300	>300	68	80	25	0,31	R1597W
Famille K	27	182	>300	>300	109	119	24	0,20	I1628T
	<b>Moyenne ± ET</b>	-	-	-	<b>60,4 ± 27,33</b>	<b>60 ± 33</b>	<b>22 ± 10,3</b>	<b>0,4 ± 0,16</b>	-

Tous les patients présentaient une RIPA diminuée à toutes les concentrations de ristocétine. Chez tous, le rapport VWF:RCo/VWF:Ag est <0,7, en faveur d'un type 2. L'étude des multimères a été réalisée chez tous les patients, et mettait en évidence une absence de multimères de HPM et IPM, orientant vers le type 2A.

Dans 4 familles (H, I, J et K), une étude de la biologie moléculaire a permis de mettre en évidence une mutation au niveau du domaine A2 du VWF, typique de ce variant moléculaire (sous-type IIA).

**Tableau 10:** Résultats chez les patients avec VWD de type 2M

	N°	Plaq. (10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup> )	PFA ADP (sec.)	PFA Epi (sec.)	FVIII:C (UI/dl)	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:RCo/ VWF:Ag	Multimères du VWF	Mutation (exon 28 du gène du VWF)
Famille L	28.1	228	>300	>300	38	21	11	0,50	Normaux	ND
	28.2	291	>300	>300	53	20	9	0,50	Normaux	ND
Famille M	29	264	ND	ND	ND	27	4	0,15	Normaux	G1324A
Famille N	30	249	>218	>300	63	53	13	0,25	Absence des THPM	R1374L
Famille O	31	199	>300	>261	36	24	9	0,40	Absence des THPM	R1374L
Famille P	32	267	>250	>250	62	29	13	0,50	Absence des THPM	R1315C
Famille Q	33.1	208	ND	>194	63	29	12	0,40	Absence des THPM	R1374C
	33.2	192	>300	>250	52	26	11	0,40	Absence des THPM	R1374C
	<b>Moyenne ± ET</b>	-	-	-	-	<b>28,6 ± 9,8</b>	<b>10,3 ± 3,8</b>	<b>0,39 ± 0,14</b>	-	-

Tous les patients ont un rapport VWF:RCo/VWF:Ag <0,7, orientant vers un type 2 de VWD. Chez tous les patients, l'étude des multimères a été réalisée et montre soit une répartition strictement normale, soit une discrète anomalie à type d'absence des multimères de THPM. La biologie moléculaire, réalisée chez 5 familles sur 6, a mis en évidence une mutation dans le domaine A1, confirmant le type 2M. Nous pouvons noter que dans 4 familles, il s'agit d'un type 2M "atypique" (également décrit "2A-like") avec discrète anomalie des multimères.

**Tableau 11A:** Résultats des patients atteints d'un AVWS lié à un RAo

N°	Pla. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	PFA Epi (sec.)	PFA ADP (sec.)	FVIII:C (UI/dl)	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:RCo/VWF:Ag
34	152	>271	223	69	76	79	1,04
35	463	178	121	175	124	118	0,95
36	232	>263	>275	46	62	53	0,85
<b>Moyenne ± ET</b>	-	-	-	<b>96 ± 68,8</b>	<b>87 ± 32,5</b>	<b>83 ± 32,7</b>	<b>0,95 ± 0,09</b>

Chez les patients avec RAo, les taux de VWF:RCo et de VWF:Ag restent dans les limites de la normale, de même que le rapport VWF:RCo/VWF:Ag; c'est le contexte clinique et/ou le résultat du PFA-100<sup>®</sup> qui ont permis d'évoquer le AVWS.

**Tableau 11B:** Résultats des patients atteints d'un AVWS lié à une MGUS

N°	Pla. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	PFA Epi (sec.)	PFA ADP (sec.)	FVIII:C (UI/dl)	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:RCo/VWF:Ag
37	258	>265	>300	20	9	4	0,44
38	312	>300	>300	52	31	16	0,52
39	247	>265	>300	45	21	10	0,48
<b>Moyenne ± ET</b>	-	-	-	<b>39 ± 16,8</b>	<b>20,3 ± 12,3</b>	<b>10 ± 5,5</b>	<b>0,46 ± 0,05</b>

Chez les patients avec MGUS, les taux de VWF:RCo et de VWF:Ag sont notablement abaissés et chez les 3 patients le rapport VWF:RCo/VWF:Ag est < 0,7.

## **2. Protocole opératoire pour l'étude de la liaison du VWF au collagène (VWF: CB)**

Nous avons utilisé une technique dérivée de la méthode décrite par Favalaro (Favalaro et al., 1991).

### a) Matériel:

- **Plaques de microtitration**, non stériles, de 96 puits à fond plat. Ces plaques nous ont été offertes par la Société CML (NEMOURS).
- **Pipette multicanaux** de 50 à 200 µl
- **Pipettes réglables**
- **Lecteur de plaque Thermomax**

### b) Réactifs:

- **Collagène SIGMA type III** extrait de placenta humain (réf. C4407): il existe sous forme de flacons de 1 mg ou 5 mg à reconstituer par une solution d'acide acétique 50 mM pour obtenir une solution mère à 1mg/ml (à faire 24 heures avant le coating).

**Pour le coating , préparer une solution à concentration finale de 50 µg/ml en acide acétique 50 mM.**

- **Collagène HORM type I à 95% et collagène de type III à 5%** extrait de tendon de cheval préparé par NYCOMED. Solution mère à 1 mg/ml à diluer en tampon HORM (solution de glucose isotonique de pH 2,8).

**Pour le coating , préparer une solution à concentration finale de 50 µg/ml en tampon Horm.**

- **Tampon phosphate (PBS) pH 7,4:**
  - Phosphate disodique, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydre 40 mM,
  - Phosphate monosodique NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O 10 mM
  - Chlorure de sodium, NaCl 150 mM.
- **Tampon de lavage:** tampon PBS pH 7,4 + Tween (0,1%)
- **Tampon de dilution:** tampon PBS pH 7,4 + Tween (0,05%) + Sérum Albumine Bovine (SAB) (Sigma) 3%
- **Immunoconjugué anti-VWF-peroxydase (DAKO):** prêt à l'emploi, dilué au 1/1000 en tampon PBS pH 7,4 SAB 3%

- **Système de révélation:** Orthophénylenediamine (OPD) comprimés SIGMA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%
- **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M**
- **Plasma standard titré** (BEHRING-Réf. ORKL): à reconstituer avec 1 ml d'eau distillée. Stabiliser 30 minutes à température ambiante.

c) Mode opératoire:

*Ce mode opératoire est valable pour le collagène **HORM** et le collagène de type **III Sigma**.*

➤ J-3: étape de coating:

Répartir à la pipette multicanaux, **200 µl par puits** de la solution de **collagène à 50 µg/ml**.

Couvrir avec deux parafilms et incuber 65 à 70 heures dans une **pièce climatisée** à 23 °C.

➤ J0:

i. Préparation de la gamme d'étalonnage et des échantillons à tester:

Les dilutions se font en **tampon de dilution** (voir b.)

La **gamme d'étalonnage** est réalisée à partir du plasma standard titré à cinq dilutions :

1/10, 1/20, 1/40, 1/100, 1/200, 1/400, 1/1000.

Les **échantillons à tester**: deux dilutions par plasma, choisies en fonction du taux attendu.

Comme il **n'existe pas de contrôle de qualité** commercialisé pour le VWF:CB, nous avons choisi comme contrôle interne deux plasmas de patients atteints de VWD de type 1. Le plasma dosé lors de chaque série utilisant le collagène I avait été trouvé autour de 20%, celui ayant servi pour chaque série utilisant le collagène III avait été trouvé autour de 40%. Ceci nous a permis de calculer la reproductibilité de notre test.

ii. Réalisation du test:

- Après 65 à 70 heures de coating, réaliser 5 lavages en **tampon de lavage** (voir b.).
- Répartir en **double** les dilutions de la gamme d'étalonnage et des plasmas à tester à raison de **200 µl** par puits.
- Incuber **2 heures** dans la pièce climatisée.
- Laver 5 fois.
- Répartir 200 µl d'**immunoconjugué**.
- Incuber **2 heures** dans la pièce climatisée.

- Laver 5 fois.
- Répartir **200 µl** du mélange **OPD + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** préparé **extemporanément**.
- Laisser la coloration se développer à l'**obscurité** environ **15 minutes**.
- Répartir 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M pour **arrêter la réaction**.
- Agiter doucement sur un vortex de microplaque pendant une minute
- Laisser stabiliser environ 10 minutes.
- Lire les **densités optiques** (DO) obtenues à 490 nm. Les DO ainsi obtenues sont traitées par le logiciel de calcul intégré au lecteur qui trace la courbe d'étalonnage et transforme directement les DO des échantillons en taux (%) de VWF :CB corrigé du facteur de dilution.

La relation mathématique "4 paramètres" a été choisie pour ce test; le coefficient de corrélation (r) doit être  $\geq 0,998$ .

### **3. Analyse statistique:**

Les calculs des moyennes, écarts-types et coefficients de variation ont permis l'étude de la dispersion des mesures.

Le coefficient de Pearson (r) permet d'étudier la relation existant entre deux techniques.

Les comparaisons des résultats sont effectuées deux par deux à l'aide d'un test non paramétrique (test de Wilcoxon) lorsque les valeurs sont appariées.

Nous avons utilisé le test de Mann et Whitney dans le cas de comparaison de valeurs non appariées.

Une valeur de p supérieure à 0,05 est considérée comme non significative.

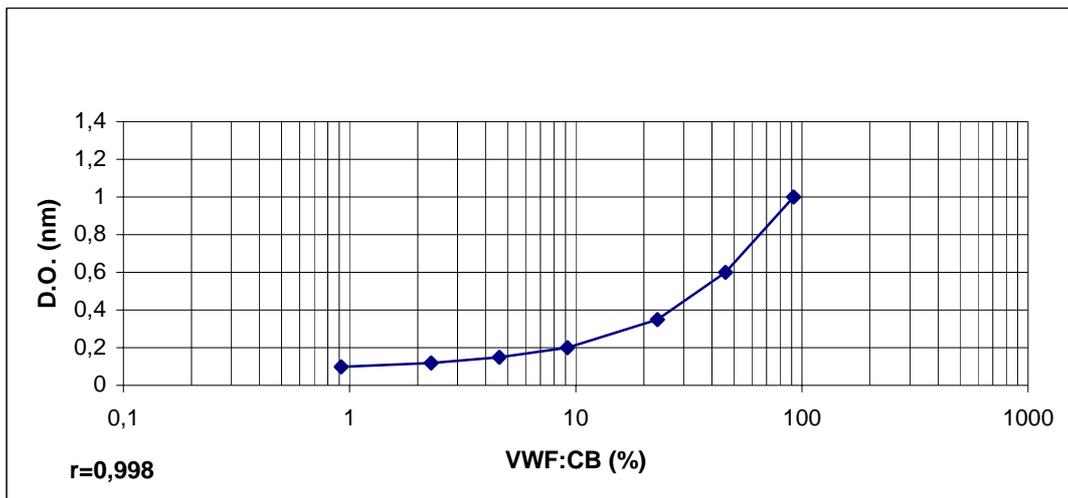
Les graphiques, moyennes et écarts-types ont été réalisés sur logiciels Excel et Power Point sous Windows.

# RESULTATS

## 1. Evaluation analytique de la méthode:

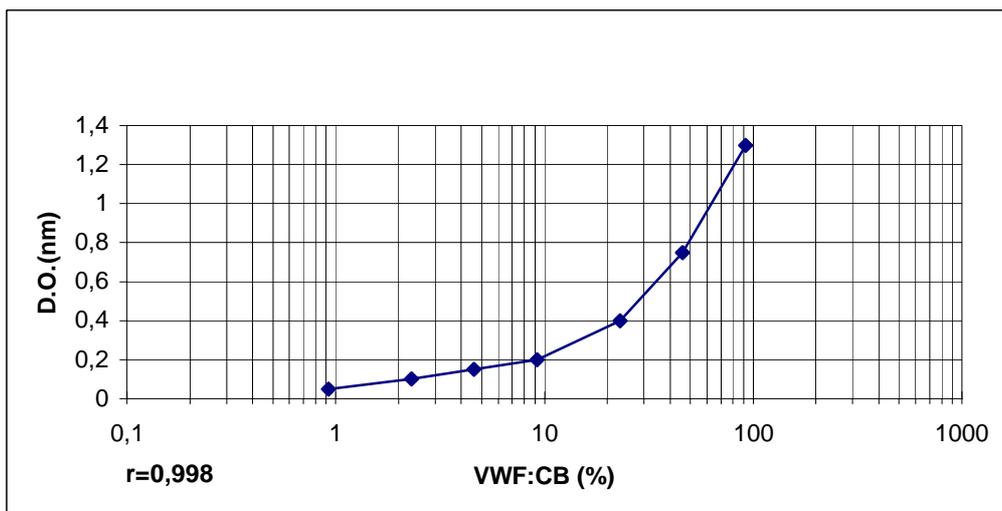
### a) Etalonnage:

➤ Courbe d'étalonnage obtenue avec le collagène HORM:



**Figure 6:** Courbe d'étalonnage du VWF:CB, avec le collagène HORM. En abscisse le taux de VWF:CB (échelle logarithmique), en ordonnée la DO obtenue à 450/492 nm (échelle arithmétique).

➤ Courbe d'étalonnage obtenue avec le collagène de type III:



**Figure 7:** Courbe d'étalonnage du VWF:CB, avec le collagène de type III. En abscisse le taux de VWF:CB (échelle logarithmique), en ordonnée la DO obtenue à 450/492 nm (échelle arithmétique).

**b) Reproductibilité:**

Deux plasmas de patients avec VWD de type 1 ont été choisis pour calculer la reproductibilité du test. Le premier a été passé dans 10 séries utilisant le collagène HORM, le second a été passé dans 10 séries utilisant le collagène de type III (voir Matériel et Méthode 2. c) i.).

**Tableau 12:** Résultats du test de reproductibilité du VWF:CB (%).

	<b>collagène HORM</b>	<b>Collagène III</b>
	18,00	54,00
	20,00	30,00
	25,00	46,00
	24,00	47,00
	22,00	35,00
	36,00	32,00
	29,00	40,00
	25,00	48,00
	21,00	59,00
<b>MOYENNE</b>	<b>24,44</b>	<b>43,44</b>
<b>Ecart Type</b>	<b>5,41</b>	<b>9,93</b>
<b>CV (%)</b>	<b>22%</b>	<b>23%</b>

CV= Coefficient de Variation

**c) Répétabilité:**

➤ Collagène HORM:

Un plasma de patient avec VWD de type 1 a été testé 10 fois dans la même série, à la même dilution en tampon PBS-tween-SAB.

**Tableau 13:** Résultats du test de répétabilité du VWF:CB (%)

<b>Ordre</b>	<b>DO</b>	<b>Concentration</b>
1	0,475	28
2	0,487	30
3	0,459	26
4	0,409	21
5	0,418	22
6	0,390	19
7	0,417	21
8	0,443	24
9	0,455	25
10	0,473	28
<b>Moyenne</b>	<b>0,443</b>	<b>24,4</b>
<b>Ecart type</b>	<b>0,033</b>	<b>3,63</b>
<b>CV (%)</b>	<b>7,45</b>	<b>14,88</b>

➤ Collagène de type III:

Le plasma d'un patient avec VWD de type I a été testé 10 fois dans la même série, à la même dilution en tampon PBS-tween-SAB.

**Tableau 14:** Résultats du test de répétabilité du VWF:CB (%)

Ordre	DO	Concentration
1	0,285	18
2	0,279	17
3	0,272	17
4	0,283	18
5	0,311	21
6	0,268	16
7	0,314	21,7
8	0,326	23,5
9	0,305	20
10	0,309	21,4
<b>Moyenne</b>	<b>0,295</b>	<b>19,36</b>
<b>Ecart type</b>	<b>0,020</b>	<b>2,495</b>
<b>CV (%)</b>	<b>6,78</b>	<b>12,89</b>

d) Limite de détection:

Elle est définie comme étant la plus petite concentration de VWF significativement différente de zéro avec un risque de 5%.

La limite de détection a été établie, pour le collagène HORM et pour le collagène de type III, en comparant dans 10 séries différentes les DO du tampon avec le dernier point de calibration (1%).

**Tableau 15:** Résultats du test de reproductibilité du tampon et du dernier point d'étalonnage (1/1000) exprimés en DO, pour le collagène HORM.

	DO tampon	DO étalon
1	0,030	0,161
2	0,032	0,123
3	0,021	0,144
4	0,027	0,130
5	0,031	0,161
6	0,034	0,134
7	0,030	0,190
8	0,043	0,143
9	0,022	0,105
10	0,021	0,153
<b>Moyenne</b>	<b>0,029</b>	<b>0,144</b>
<b>Ecart type</b>	<b>0,007</b>	<b>0,024</b>

La DO obtenue pour le dernier point de gamme est significativement différente ( $p < 0,001$ ) de la DO du tampon. La limite de détection est donc fixée à 1% pour le collagène de type HORM.

**Tableau 16:** Résultats du test de reproductibilité du tampon et du dernier point d'étalonnage (1/1000) exprimés en DO, pour le collagène de type III

	<b>DO tampon</b>	<b>DO étalon</b>
1	0,033	0,064
2	0,027	0,072
3	0,030	0,084
4	0,027	0,066
5	0,027	0,095
6	0,026	0,057
7	0,025	0,093
8	0,030	0,060
9	0,032	0,067
10	0,026	0,068
<b>Moyenne</b>	<b>0,028</b>	<b>0,073</b>
<b>Ecart type</b>	<b>0,003</b>	<b>0,013</b>

La DO obtenue pour le dernier point de gamme est significativement différente de la DO du tampon ( $p < 0,001$ ). La limite de détection est donc fixée à 1% pour le collagène de type III.

## 2. Résultats dans la population témoin:

a) Résultats du VWF:CB avec les deux types de collagènes:

**Tableau 17:** Résultats du VWF:CB dans la population témoin.

N°	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:RCo/ VWF:Ag	VWF:CB Collagène HORM (%)	VWF:CB HORM/ VWF:Ag	VWF:CB Collagène III (%)	VWF:CBIII/ VWF:Ag
1	105	84	0,8	86	0,75	88	0,77
2	87	77	0,89	74	0,81	86	0,95
3	96	76	0,79	130	1,25	150	1,44
4	89	83	0,93	110	1,15	119	1,24
5	68	69	1,01	76	0,85	80	0,90
6	47	54	1,15	62	0,89	66	0,94
7	138	146	1,06	180	1,22	190	1,29
8	104	101	0,97	100	0,93	110	1,03
9	66	68	1,03	76	1,09	62	0,89
10	107	117	1,09	128	1,12	115	1,01
11	108	123	1,14	130	1,12	150	1,29
12	119	126	1,06	66	0,57	69	0,60
13	100	113	1,13	150	1,53	150	1,53
14	86	76	0,88	66	0,96	70	1,01
15	61	57	0,93	62	0,98	75	1,19
16	88	98	1,11	75	0,76	70	0,71
17	74	69	0,93	110	1,33	110	1,33
18	81	88	1,09	90	1,08	91	1,10
19	52	55	1,06	45	0,66	42	0,62
20	60	47	0,78	79	1,23	76	1,19
<b>Moyenne (± ET)</b>	<b>86,8 ± 22,3</b>	<b>83 ± 27,3</b>	<b>0,99 ± 0,11</b>	<b>95 ± 34,5</b>	<b>1,01 ± 0,24</b>	<b>98,45 ± 37,8</b>	<b>1,05 ± 0,26</b>

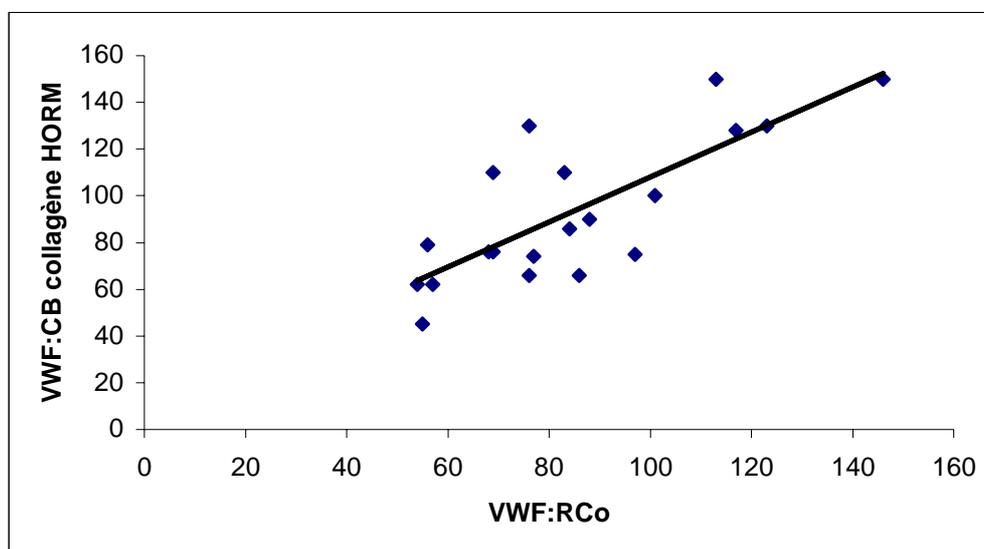
VWF:CB HORM correspond aux résultats des dosages effectués avec le collagène HORM;

VWF:CBIII correspond aux résultats des dosages effectués avec le collagène de type III.

Il n'existe pas de différence statistiquement significative ( $p < 0,001$ ) entre les résultats obtenus avec le collagène HORM et ceux obtenus avec le collagène de type III.

b) Etude de corrélation entre VWF:RCo et VWF:CB:

**Figure 8:** Corrélation entre VWF:RCo et VWF:CB chez les sujets témoins (n=20)



Chez les sujets normaux, les deux techniques VWF:RCo et VWF:CB HORM sont bien corrélées avec un coefficient ( $r=0,777$ ;  $p<0,001$ ). Le choix du collagène HORM sera justifié plus loin.

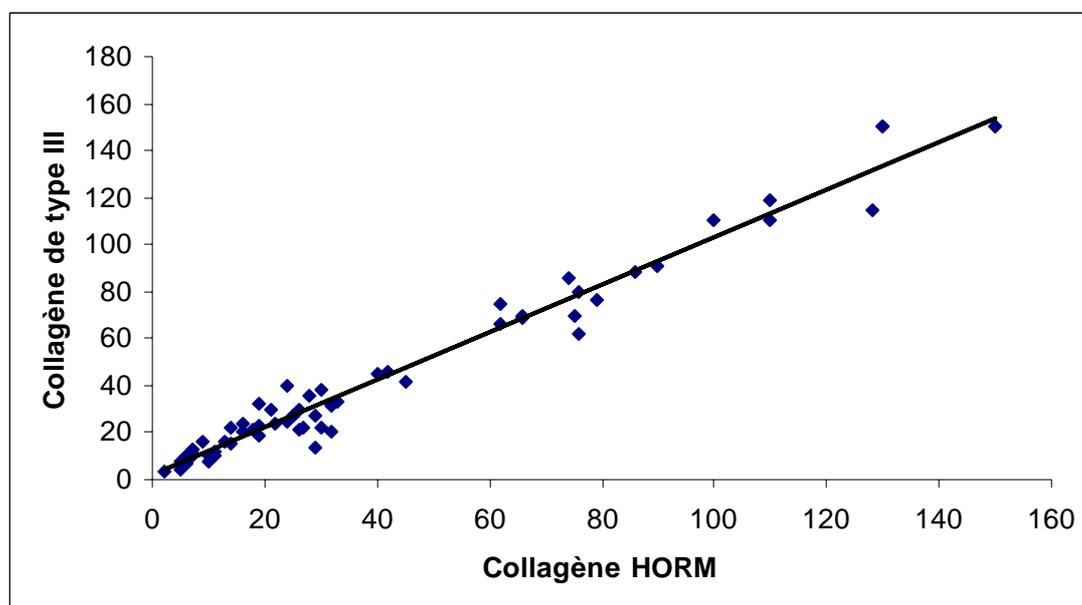
Selon le test de Wilcoxon, il n'est pas mis en évidence de différence statistiquement significative entre les résultats de VWF:RCo et de VWF:CB dans la population témoin ( $p=0,075$ ).

### **3. Résultats dans la population étudiée:**

Chaque prélèvement est mesuré en double et à deux dilutions différentes. Le résultat est accepté si le CV des deux mesures est inférieur à 15%. En cas de discordance entre le résultat des deux dilutions, le plasma est testé à nouveau à deux dilutions dans la série suivante.

a) Avec les deux types de collagènes:

**Figure 9:** Etude de corrélation entre le collagène HORM et le collagène de type III pour tous les patients et les témoins.



Tous les sujets sains et tous les patients ont bénéficié d'un dosage de VWF:CB avec le collagène HORM (Collagène de type I 95%, collagène de type III 5%) et le collagène de type III. Les résultats obtenus ont permis de montrer une très bonne corrélation entre les deux types de collagènes avec un coefficient ( $r$ )=0,986 ( $p<0,001$ ). L'équation de la droite est  $y=1,014x+1,84$ , ce qui nous permet de conclure qu'il n'existe de pas de différence entre les deux types de collagènes.

**Pour la suite de nos résultats, nous avons choisi de travailler avec les résultats obtenus à partir du collagène HORM, ce choix sera justifié dans la discussion.**

a) Patients atteints de VWD de type 1:

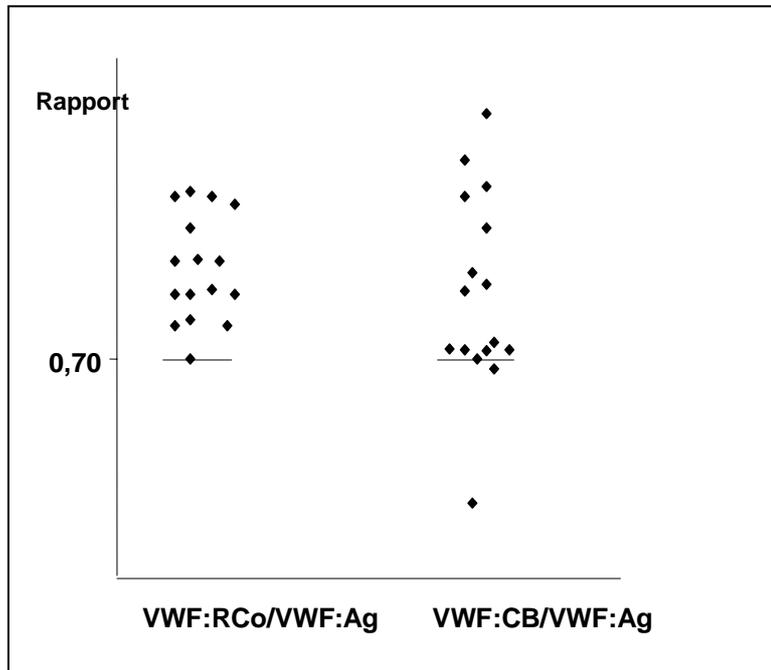
**Tableau 18:** Résultats du VWF:CB et du rapport VWF:CB/VWF:Ag chez les patients avec VWD de type 1 (comparés aux autres résultats).

N°	PFA Epi (sec.)	PFA ADP (sec.)	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:CB (%)	VWF:RCo/VWF:Ag	VWF:CB/VWF:Ag
1	>300	204	20	18	24	0,90	1,20
2	>300	>300	8	10	2	1,20	0,25
3	>250	>250	46	33	32	0,70	0,70
4	252	172	22	24	32	1,00	1,45
5	225	175	28	26	21	0,90	0,75
6	214	148	42	33	30	0,80	0,71
7	235	165	26	30	32	1,20	1,23
8	240	128	40	40	29	1,00	0,73
9	>300	221	27	23	25	0,90	0,93
10	>250	188	42	34	28	0,80	0,67
11	171	180	32	38	42	1,20	1,31
12	156	136	30	37	33	1,20	1,10
13	>300	>200	27	22	26	0,80	0,96
14	159	127	33	35	30	1,00	0,91
15	>300	173	26	29	22	1,10	0,73
16	>300	216	26	24	19	0,90	0,73
<b>Moyenne ± ET</b>	- -	- -	<b>30 ± 6,8</b>	<b>28,5 ± 8,1</b>	<b>26,7 ± 8,6</b>	<b>1 ± 0,17</b>	<b>0,90 ± 0,26</b>

Un patient (n°2) présente un taux de VWF:CB très bas, alors que le rapport VWF:RCo/VWF:Ag est > 0,7. Tous les autres patients ont un taux de VWF:CB corrélé avec le taux de VWF:RCo et un rapport VWF:CB/VWF:Ag > 0,7.

Les résultats des rapports son détaillés figure 10.

**Figure 10:** Comparaison des rapports VWF:RCo/VWF:Ag et VWF:CB/VWF:Ag chez les patients avec VWD de type 1.



L'étude des rapports (figure 10) VWF:RCo/VWF:Ag et VWF:CB/VWF:Ag, montre que ceux-ci sont  $> 0,7$  dans 15 cas sur 16.

Le patient n°2 présente un rapport VWF:RCo/VWF:Ag  $> 0,7$ , c'est pourquoi il avait été classé VWD de type 1: le rapport VWF:CB/VWF:Ag est  $< 0,3$ , ce qui doit nous amener à reconsidérer sa classification, à réaliser une étude de la répartition des multimères, une analyse du gène du VWF et à réétudier le contexte clinique.

b) Patients atteints de VWD de type 2:

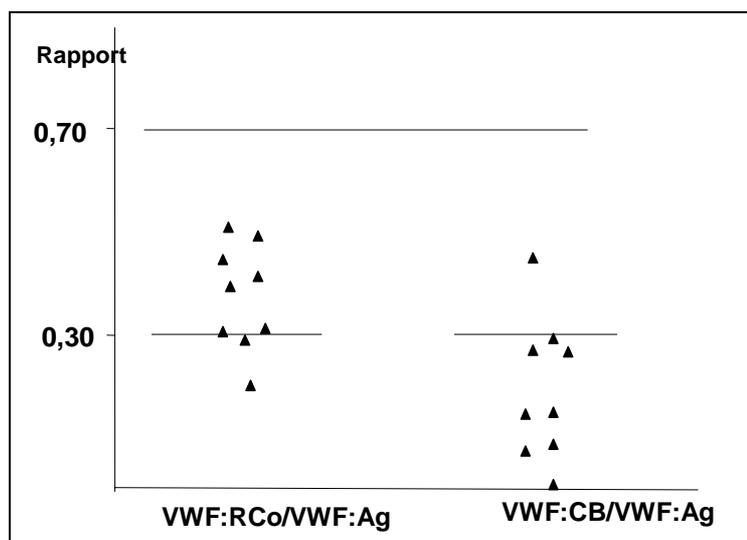
➤ VWD de type 2A:

**Tableau 19:** Résultats du VWF:CB et du rapport VWF:CB/VWF:Ag chez les patients avec VWD de type 2A (comparés aux autres résultats).

Famille	N°	PFA Epi (sec.)	PFA ADP (sec.)	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:CB (%)	VWF:RCo/VWF:Ag	VWF:CB/VWF:Ag
⊖	23	>300	>300	31	9	14	0,29	0,45
⊕	24.1	>300	>300	67	30	6	0,45	0,09
	24.2	>300	>300	87	36	13	0,41	0,15
	24.3	>300	>300	48	19	7	0,40	0,15
	24.4	>300	258	67	33	18	0,49	0,27
-	25.1	ND	ND	25	5	7	0,20	0,28
	25.2	ND	ND	26	8	5	0,31	0,19
↷	26	>300	>300	80	25	6	0,31	0,08
↘	27	>300	>300	119	24	2	0,20	0,02
	<b>Moyenne ± ET</b>	- -	- -	<b>60 ± 33</b>	<b>22 ± 10,3</b>	<b>8,5 ± 5,15</b>	<b>0,40 ± 0,16</b>	<b>0,19 ± 0,14</b>

Comme on pouvait s'y attendre, tous les patients ont un VWF:CB très abaissé et un rapport VWF:CB/VWF:Ag également très abaissé. Le VWF:CB est chez 7 patients notablement plus anormal que le VWF:RCo.

**Figure 11:** Comparaison des rapport VWF:RCo/VWF:Ag et VWF:CB/VWF:Ag chez les patients VWD de type 2A.



Sur ce graphique, nous constatons que, le rapport VWF:RCo/VWF:Ag est  $< 0,7$  dans tous les cas, et le rapport VWF:CB/VW:Ag est  $< 0,7$  dans 9 cas sur 9 et inférieur à 0,3 dans 8 cas sur 9.

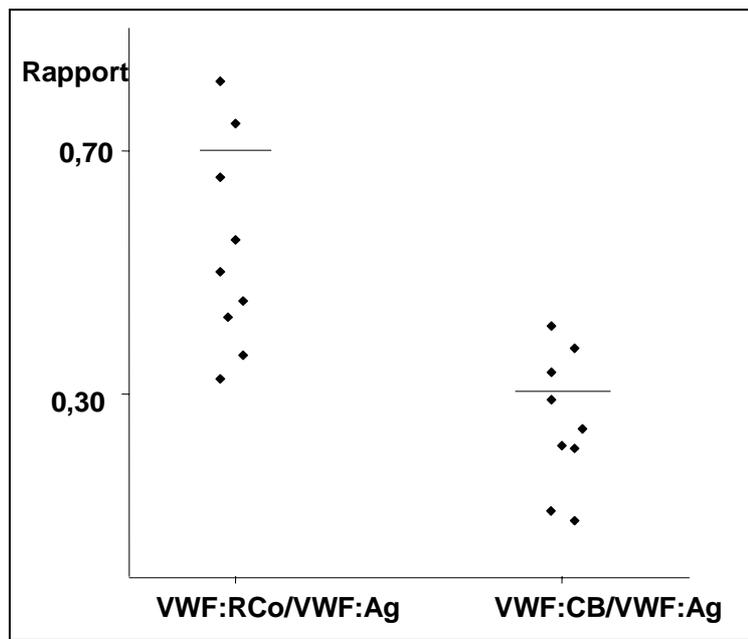
➤ **VWD de type 2B:**

**Tableau 20:** Résultats du VWF: CB et du rapport VWF:CB/VWF:Ag chez les patients avec VWD de type 2B (comparés aux autres résultats).

Famille	N°	PFA Epi (sec.)	PFA ADP (sec.)	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:CB (%)	VWF:RCo/VWF:Ag	VWF:CB/VWF:Ag
A	17	>300	>300	47	20	11	0,43	0,23
B	18	ND	ND	39	29	16	0,74	0,41
C	19.1	ND	ND	28	14	6	0,50	0,43
	19.2	>300	>300	29	16	7	0,55	0,24
D	20	>300	>300	31	14	9	0,45	0,29
E	21.1	>300	>246	43	35	9	0,81	0,21
	21.2	>300	>300	32	21	12	0,66	0,38
F	22.1	ND	ND	55	20	5	0,36	0,09
	22.2	>300	>300	32	12	4	0,38	0,13
	<b>Moyenne ± ET</b>	-	-	<b>38 ± 9,3</b>	<b>20 ± 7,6</b>	<b>9,1 ± 3,8</b>	<b>0,54 ± 0,17</b>	<b>0,25 ± 0,11</b>

Chez les patients avec VWD de type 2B, le VWF:CB est aussi notablement plus anormal que le VWF:RCo. Tous les patients ont un rapport VWF:CB/VWF:Ag ( $< 0,3$  dans 6 cas sur 9) plus anormal que le rapport VWF:RCo/VWF:Ag.

**Figure 12:** Comparaison des rapport VWF:RCo/VWF:Ag et VWF:CB/VWF:Ag chez les patients VWD de type 2B



Fait intéressant, les deux patients qui avaient un rapport VWF:RCo/VWF:Ag  $> 0,7$ , ont un rapport VWF:CB/VWF:Ag anormal en faveur d'un type 2.

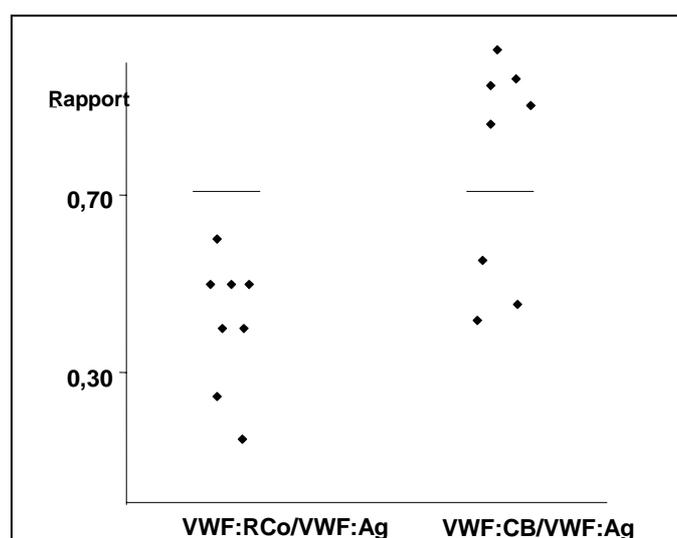
➤ VWD de type 2M:

**Tableau 21:** Résultats du VWF:CB et du rapport VWF:CB/VWF:Ag chez les patients avec VWD de type 2M (comparés aux autres résultats).

Famille	N°	PFA ADP (sec.)	PFA Epi (sec.)	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:CB (%)	VWF:RCo /VWF:Ag	VWF:CB/ VWF:Ag	Multimères du VWF
L	28.1	>300	>300	21	11	19	0,50	0,90	Normaux
	28.2	>300	>300	20	9	19	0,50	0,95	Normaux
M	29	ND	ND	27	4	26	0,15	0,96	Normaux
N	30	>218	>300	53	13	24	0,25	0,45	Absence des THPM
O	31	>300	>261	24	9	10	0,40	0,42	Absence des THPM
P	32	>250	>250	29	13	16	0,50	0,55	Absence des HPM
Q	33.1	-	>194	29	12	25	0,40	0,86	Absence des THPM
	33.2	>300	>250	26	11	27	0,40	1,04	Absence des THPM
	<b>Moyenne ± ET</b>	-	-	<b>28,6 ± 10</b>	<b>10,3 ± 3</b>	<b>20,8 ± 5,8</b>	<b>0,39 ± 0,13</b>	<b>0,77 ± 0,35</b>	-

Tous les patients ont un taux de VWF:CB abaissé; mais, contrairement aux patients avec VWD de type 2A ou de type 2B, le VWF:CB est moins anormal que le VWF:RCo.

**Figure 13:** Comparaison des rapports VWF:RCo/VWF:Ag et VWF:CB/VWF:Ag chez les patients avec VWD de type 2M.



Tous les patients présentent un rapport VWF:RCo/VWF:Ag <0,7; par contre, la répartition des rapports VWF:CB/VWF:Ag est très hétérogène, quelque soit la distribution des multimères. Le rapport VWF:CB/VWF:Ag est > 0,7 chez 5 patients et < 0,7 chez 3 patients.

c) Patient atteint de VWD de type 3:

Un seul patient atteint de VWD de type 3 a été testé, à titre de contrôle. Le déficit quantitatif en VWF étant total, tous les dosages antigéniques et fonctionnels du VWF sont nuls. De même le VWF:CB a été retrouvé inférieur à la limite de détection, soit < 1 %.

d) Patients atteints d'un syndrome de Willebrand acquis:

**Tableau 22 A:** Résultats du VWF:CB et du rapport VWF:CB/VWF:Ag chez les patients atteints d'un AVWS lié à un RAO.

N°	PFA Epi (sec.)	PFA ADP (sec.)	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:CB (%)	VWF:RCo/VWF:Ag	VWF:CB/VWF:Ag
35	>271	223	76	79	28	1,04	0,37
36	178	121	124	118	34	0,95	0,27
37	>263	>275	62	53	33	0,85	0,53
<b>Moyenne ± ET</b>	-	-	<b>87 ± 32,5</b>	<b>83 ± 32,7</b>	<b>31,7 ± 3,2</b>	<b>0,95 ± 0,09</b>	<b>0,4 ± 0,13</b>

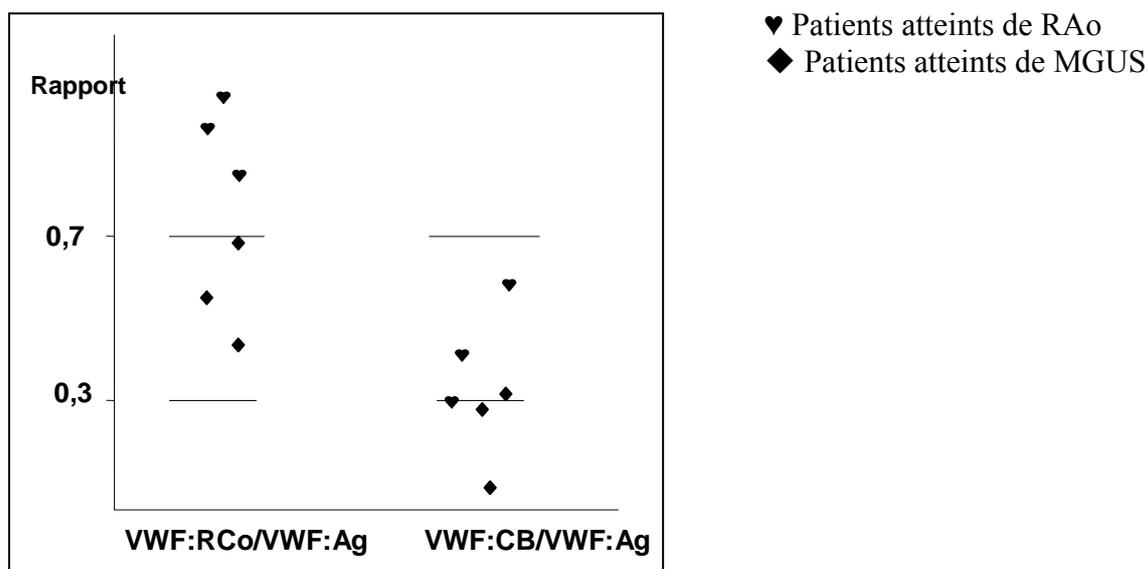
Les patients avec un RAO, qui ne présentaient pas de déficit en VWF:Ag et VWF:RCo, ont un VWF:CB anormal, expliquant l'allongement du TO sur PFA-100®.

**Tableau 22B:** Résultats du VWF:CB et du rapport VWF:CB/VWF:Ag chez les patients atteints d'un AVWS lié à une MGUS.

N°	PFA Epi (sec.)	PFA ADP (sec.)	VWF:Ag (UI/dl)	VWF:RCo (UI/dl)	VWF:CB (%)	VWF:RCo/VWF:Ag	VWF:CB/VWF:Ag
38	>265	>300	9	<5	2	0,44	0,22
39	>300	>300	31	16	2	0,52	0,06
40	>265	>300	21	10	6	0,48	0,29
<b>Moyenne ± ET</b>	-	-	<b>20,3 ± 12,3</b>	<b>10 ± 5,5</b>	<b>3,3 ± 2,3</b>	<b>0,46 ± 0,05</b>	<b>0,2 ± 0,12</b>

Chez les trois patients avec MGUS, le VWF:CB est très abaissé.

**Figure 14:** Etude des rapport VWF:RCo/VWF:Ag et VWF:CB/VWF:Ag chez les patients AVWS.



Chez tous les patients avec AVWS, le rapport VWF:CB/VWF:Ag est plus anormal que le rapport VWF:RCo/VWF:Ag.

e) Comparaisons statistiques:

	VWF:Ag	VWF:RCo	VWF:RCo/VWF:Ag	VWF:CB	VWF:CB/VWF:Ag
<b>Groupes de patients comparés à la population témoin</b>					
VWD de type 1	p<0,0001	p<0,0001	NS	p<0,0001	NS
VWD de type 2A et 2B	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
VWD de type 2M	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	NS
VWD acquis MGUS	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
VWD acquis RAo	NS	NS	NS	p<0,0001	p<0,0001
<b>Groupes de patients comparés entre eux</b>					
VWD type 2A+2B vs VWD type 1	P=0,01	p<0,01	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
VWD type 2M vs VWD type 1	NS	p<0,0001	p<0,0001	p<0,01	NS

**Tableau 23:** Comparaisons statistiques de nos résultats selon le test de Mann et Whitney. La différence est considérée comme non significative pour  $p > 0,05$ . (NS= Non significatif)

Les résultats de ce tableau seront commentés dans la discussion.

## **DISCUSSION**

### **1. Méthodologie:**

#### a) Mise au point:

Du point de vue méthodologique, cette technique ELISA est considérée comme de réalisation simple, plus facile que le VWF:RCo. Notre étude nous incite à moduler cet avis. En effet, une plaque de 96 puits, demande en moyenne 8 heures de travail et nécessite la préparation du coating 3 jours avant. Ces conditions de travail font que ce test n'est pas réalisable ni en urgence ni en unitaire, et donc ne peut en aucun cas remplacer l'étude du VWF:RCo, qui est réalisable en agglutination sur plaque en 10 minutes environ. De plus, nous n'avons pas obtenu la même performance en terme de densité optique (DO) que celle rapportée dans la littérature (Favaloro et al., 1991). En effet, dans nos conditions, les DO sont plus faibles que celles décrites par Favaloro. Nous avons modifié plusieurs paramètres: les dilutions du standard utilisé pour la droite d'étalonnage, ainsi que les concentrations d'OPD utilisées lors de la révélation, pour améliorer nos résultats. L'augmentation de la concentration en collagène lors de l'étape de coating, ainsi que l'augmentation de la durée de coating, n'ont pas permis de gain de sensibilité (résultats non rapportés). Nous avons noté une différence dans la qualité des lots de collagène HORM. En effet, sur les trois lots que nous avons utilisés pour notre étude, le premier a montré un net déficit de sensibilité avec des DO très faibles, également retrouvé dans d'autres laboratoires utilisant ce type de collagène pour la même technique, avec le même numéro de lot. Le second était de bonne qualité. Le troisième montrait des DO de blanc plus élevées que pour les autres lots, dans les mêmes conditions de travail. Cependant, les résultats obtenus semblent corrects, puisque les tests de reproductibilité montrent un coefficient de variation (CV) de 22%, et un CV de 13 à 14% pour la répétabilité, qui sont des valeurs acceptables.

#### b) Choix d'un type de collagène:

Le choix du type de collagène est d'une grande importance dans le développement de cette technique. Il existe de nombreuses préparations de collagène sur le marché, celles-ci variant suivant le type de collagène (I, III, IV, mélanges ou non spécifié), et suivant l'origine du collagène (tendon ou peau de bovin ou de cheval, placenta humain). Dans une de ses études,

Favaloro a étudié un large panel de préparations commercialisées, étudiant la capacité de ces collagènes à se lier au VWF et à faire la discrimination entre VWD de type 1 et VWD de type 2 (Favaloro, 2000). Certains types de collagènes se révèlent inutilisables, en particulier le type IV. Cette étude montre que le collagène de type I/III (HORM-Nycomed), possède une meilleure capacité de discrimination entre VWD de type 1 et VWD de type 2 du fait de sa plus grande capacité de fixation aux multimères de HPM du VWF; elle relève également des variations dans la qualité du collagène HORM entre les différents lots (voir mise au point). Le collagène de type III, présente également de bons résultats, avec une bonne capacité de discrimination entre VWD de type 1 et de type 2. Mais l'étude des DO obtenues avec les différents types de collagènes a montré des DO très supérieures pour des taux de VWF:CB élevés, ce qui peut entraîner une surestimation des résultats. Pour Favaloro, le collagène HORM reste donc le collagène de choix pour la technique de VWF:CB, constituant la méthode de référence (Favaloro, 2000).

Au cours de ce travail, nous avons réalisé, pour chaque patient, le dosage du VWF:CB avec le collagène HORM et avec le collagène de type III (résultats non montrés individuellement). Nous avons observé une corrélation parfaite entre les résultats obtenus avec les deux types de collagène  $r=0,986$  ( $p<0,001$ ) (figure 9).

Le collagène HORM présente l'intérêt d'être conditionné sous forme soluble, ce qui évite une étape de reconstitution, donc une source d'erreur potentielle en moins dans une technique qui demande déjà beaucoup de manipulations. Nous avons basé l'étude de nos résultats sur la technique utilisant le collagène HORM, puisqu'il s'agit de la technique désignée dans la littérature comme méthode de référence.

Les collagènes de type I et III se lient au VWF par le domaine A3, seul le collagène de type VI se lie par le domaine A1 de la protéine (Romijn et al., 2003). L'étude du VWF:CB en utilisant du collagène de type VI serait intéressante, en parallèle de celle utilisant le collagène de type I et/ou III, afin de dépister de nouveaux variants fonctionnels. Mais, le collagène de type VI est difficile à se procurer et coûteux; nos essais préliminaires avec ce type de collagène, n'ont pas donné de résultat.

### c) Caractéristiques analytiques du VWF:CB:

L'évaluation de notre technique ELISA VWF:CB a montré des résultats satisfaisants. Les coefficients de variation sont à environ 22% pour les deux types de collagènes, et la limite de détection correspond à la valeur du dernier point de calibration (1%). Un travail antérieur, au niveau du laboratoire d'hémostase du CHU de Nantes, avait étudié la reproductibilité des

techniques classiques VWF:RCo et VWF:Ag : cette étude avait retrouvé des CV meilleurs, allant de 5 à 10% (résultats non publiés). On note cependant qu'il s'agit d'une comparaison intra laboratoire. Dans la littérature, les CV de reproductibilité intra laboratoires sont généralement plus bas pour le VWF:CB que pour le VWF:RCo ; ce qui indique que notre technique nécessite encore des mises au point.

En 2003, une étude a été réalisée en Australie dans 45 laboratoires : les valeurs de CV obtenues pour le VWF:CB sont de l'ordre de 24% pour les valeurs hautes et ne sont pas données pour les valeurs basses. Pour le VWF:RCo, le CV est de 18% dans les valeurs hautes et non déterminé dans les valeurs basses. Pour le VWF:Ag, les CV sont toujours meilleurs que pour le VWF:RCo et le VWF:CB (Favaloro et al., 2004).

En France, une étude multicentrique sur les différents dosages de VWF a été réalisée dans 12 centres très entraînés à la pratique de ces dosages (Meyer et al., 1998). Sur ces 12 centres, 3 avaient réalisé un dosage de VWF:CB. Deux centres utilisaient une technique ELISA "maison" avec un collagène de type III d'origine placentaire, le troisième centre utilisait un kit commercial et un ELISA "maison" avec du collagène de type I. Les CV étaient en moyenne de 23,3% avec des extrêmes de 3,6% à 42,7%. Dans cette même étude, le VWF:RCo donnait des CV de l'ordre de 30% avec des extrêmes entre 10,7% et 79,9%. Pour le VWF:Ag, les CV allaient de 6,1% à 38,7% avec une moyenne inférieure à 10%.

## **2. Etude du VWF:CB chez les sujets sains:**

Le VWF:CB et le VWF:RCo sont deux tests fonctionnels destinés à l'étude du VWF, basés sur des propriétés différentes de celui-ci. Dans notre population saine, nous retrouvons une bonne corrélation entre les deux tests ( $r=0,777$ ;  $p<0,001$ ) (figure 8). Ces données confirment celle d'un autre travail mené sur une population de 29 sujets sains (Siekmann et al., 1998). Dans notre travail, chez les sujets sains, nous trouvons pour le VWF:CB, comme pour le VWF:RCo, une grande variabilité; les valeurs extrêmes vont de 45 à 180% pour le VWF:CB et de 47 à 146 % pour le VWF:RCo. Lors de son étude, Favaloro trouvait des valeurs de VWF:CB allant de 52 à 218% chez 42 sujets normaux (Favaloro et al., 1991).

### **3. Place du VWF:CB dans le diagnostic et le typage de la VWD constitutionnelle:**

#### a) Le VWF:CB peut-il remplacer le VWF:RCo dans le diagnostic de VWD ?

Le VWF:CB, en tant que test de dépistage d'une VWD constitutionnelle, ne semble pas plus performant que le VWF:RCo, qui présente l'avantage d'être réalisable en urgence. En effet, chez tous nos patients atteints de VWD constitutionnelle, quel qu'en soit le type, les deux tests sont anormaux.

En 1991, Favaloro publiait sa première étude sur le VWF:CB et montrait ses avantages par rapport au VWF:RCo, en particulier une meilleure reproductibilité (Favaloro et al., 1991). Par la suite, d'autres auteurs ont proposés soit de remplacer le VWF:RCo par le VWF:CB (Siekman et al., 1998) (Turecek et al., 2002), soit d'en faire un test de seconde intention dans le diagnostic de VWD (Casonato et al., 2001).

Les dernières recommandations désignent le VWF:CB comme un test complémentaire du VWF:RCo, chacun étant basé sur une propriété différente du VWF (Laffan et al., 2004). Le VWF:RCo est l'examen le plus sensible à une anomalie de la liaison du VWF à la GpIb plaquettaire (associée ou non à l'absence des multimères), tandis que le VWF:CB est sensible à une anomalie de la liaison au collagène, qui est dans pratiquement tous les cas, liée à la perte des multimères de HPM. De plus, comme nous l'avons déjà dit, le VWF:RCo est un test réalisable en urgence et en unitaire.

#### b) VWF:CB dans le typage de VWD:

##### ➤ Discrimination entre VWD de type 1 et de type 2:

Dans notre étude, nous avons bien mis en évidence, une différence statistiquement significative entre les résultats de VWF:Ag, VWF:RCo et VWF:CB obtenus chez les patients VWD de type 1 et dans la population témoin, permettant d'évoquer le diagnostic de VWD; l'étude des rapports VWF:RCo/VWF:Ag et VWF:CB/VWF:Ag ( $> 0,7$ ) ne montre aucune différence significative par rapport à la population témoin (tableau 23). Nous sommes donc bien en présence d'un déficit quantitatif pur : le diagnostic est porté sur des valeurs basses de VWF, interprétées en fonction du groupe sanguin. Le patient n°2, a un rapport VWF:RCo/VWF:Ag  $> 0,7$ , ce qui avait conduit à sa classification en VWD de type 1; or le taux de VWF:CB est bas, avec un rapport VWF:CB/VWF:Ag  $< 0,3$ . Ceci amène à rediscuter

le type de VWD, à réaliser une étude des multimères et à rechercher une anomalie acquise du VWF.

Comme cela a déjà été rapporté dans la littérature, chez les patients avec VWD de types 2A et 2B, les deux tests fonctionnels VWF:RCo et VWF:CB sont largement plus abaissés que les tests immunologiques, permettant le diagnostic de déficit qualitatif (Favaloro et al., 1991) (Siekman et al., 1998). Dans notre étude, deux patients porteurs de VWD de type 2B ont un rapport VWF:CB/VWF:Ag  $< 0,7$  alors que le rapport VWF:RCo/VWF:Ag ne permettait pas le diagnostic de type 2; cependant la RIPA, réalisée systématiquement, avait permis une bonne classification de la VWD. L'expérience de l'étude française dans le cadre du réseau INSERM est la même. Le phénotype 2B n'est pas toujours typique : la thrombopénie est très souvent absente, et le rapport VWF:RCo/VWF:Ag peut être  $> 0,7$ ; l'étude du VWF:CB, associée à la RIPA permet de ne pas méconnaître ce type, dont la prise en charge thérapeutique est particulière.

En ce qui concerne le type 2M, alors que le rapport VWF:RCo/VWF:Ag permet bien d'orienter vers le type 2, le rapport VWF:CB/VWF:Ag, lui, n'est pas très discriminatif entre un type 1 et un type 2M.

➤ Discrimination entre les différents sous-types de VWD de type 2:

Dans la VWD de type 2, il existe plusieurs types d'anomalies qualitatives du VWF ayant des répercussions différentes sur la fonctionnalité du VWF et nécessitant des prises en charge différentes.

Le type 2A est caractérisé par une anomalie de liaison du VWF aux plaquettes liée à la perte des multimères de IPM et HPM. Ces multimères de HPM se lient de façon préférentielle au collagène : le VWF:CB doit donc être particulièrement anormal ( $< 0,3$ ) dans ce type de VWD.

Dans le type 2B, le VWF (surtout les multimères de HPM), présente une affinité accrue pour la GpIb plaquettaire, favorisant la clairance des multimères de HPM. Le mécanisme est donc différent du type 2A mais le déficit en VWF induit est presque comparable (perte des multimères de HPM). Au cours de notre étude nous avons analysé le VWF:CB dans ces deux variants moléculaires; les patients avec une VWD de type 2A et de type 2B ont un rapport VWF:CB/VWF:Ag abaissé, et même souvent très abaissé  $< 0,3$  : 8 cas sur 9 dans le groupe de patients avec VWD de type 2A et 6 cas sur 9 dans le groupe de patients avec VWD de type 2B.

Dans le type 2M, les résultats sont différents; dans ce variant, l'affinité du VWF pour les plaquettes est diminuée, mais cette anomalie n'est pas liée à l'absence des multimères de HPM. Ainsi, dans notre travail, alors que l'étude du rapport VWF:RCo/VWF:Ag évoque bien chez ces patients un type 2, l'étude seule du rapport VWF:CB/VWF:Ag ne permet pas toujours de les distinguer d'un type 1. L'expérience française, acquise par le réseau INSERM coordonné par le Professeur D. Meyer, a montré que ce variant moléculaire était hétérogène, avec deux sous-groupes : un phénotype 2M "typique", et un phénotype 2M "atypique" (ou "2A-like") où il existe des anomalies discrètes des multimères. On peut noter dans notre étude que les 3 patients (2 non apparentés) avec phénotype 2M "typique" (familles L et M) ont des rapports VWF:CB/VWF:Ag comparables à ceux des témoins ou des patients avec une VWD de type 1. Pour les patients avec phénotype 2M "atypique" (familles N, O, P et Q) 3 patients sur 4 non apparentés, ont un rapport VWF:CB/VWF:Ag  $< 0,7$  mais  $> 0,3$ . L'effectif est faible et n'autorise actuellement aucune conclusion.

Ainsi, comme cela a été souligné (Favaloro, 2002a; Favaloro, 2002b), le VWF:CB est particulièrement sensible aux anomalies notables de la répartition des multimères retrouvées chez les patients de type 2A et de type 2B; pour de nombreux laboratoires pour lesquels la technique d'étude de distribution des multimères n'est pas accessible, le VWF:CB peut représenter une certaine alternative.

c) Arbre décisionnel pour le diagnostic et le typage de VWD:

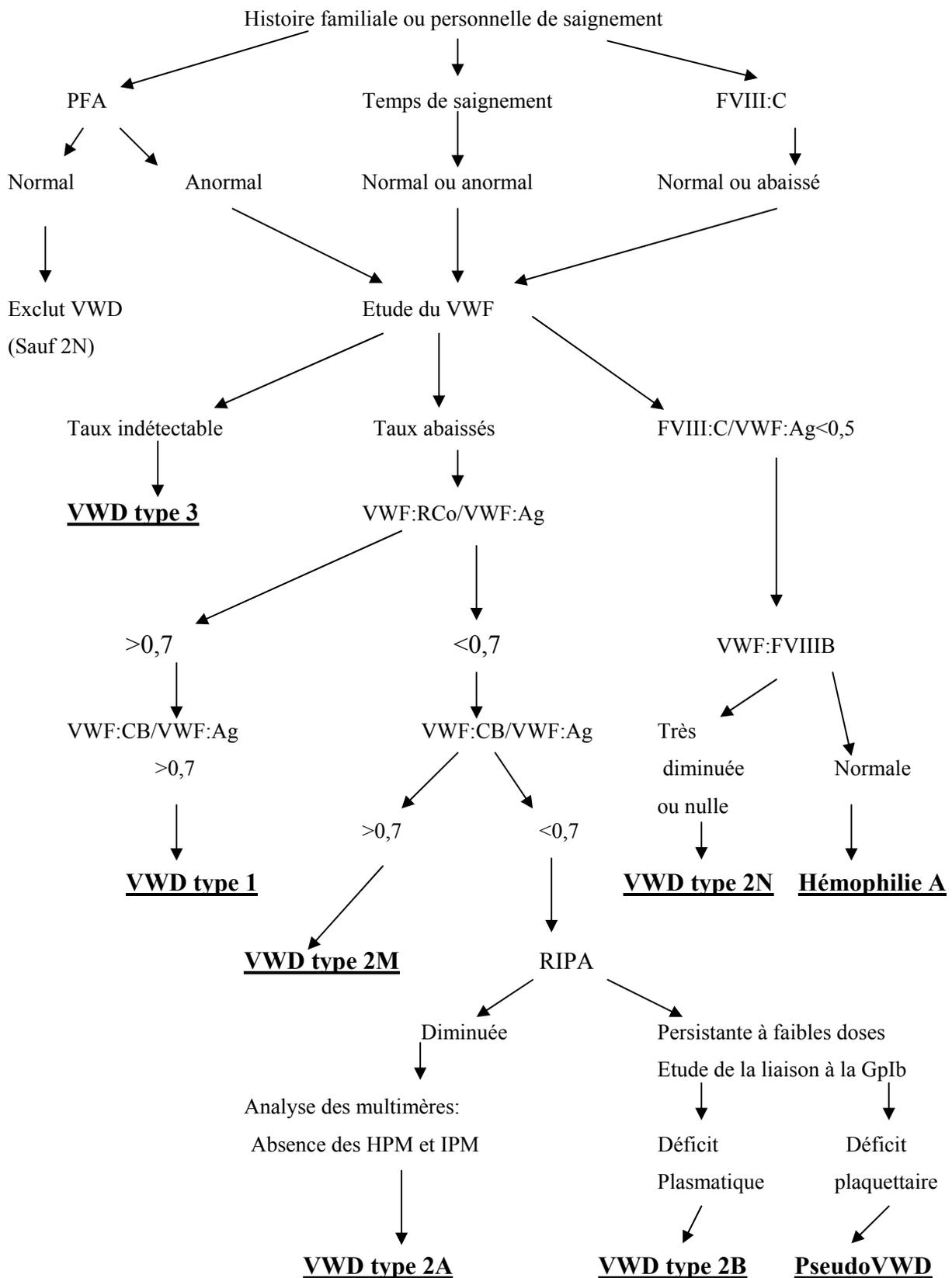
Le VWF:CB et l'étude du rapport VWF:CB/VWF:Ag a sa place pour améliorer la classification. L'algorithme décrit en figure 15 est proposé (Fressinaud et Meyer, 2004).

Le groupe de travail sur la VWD du comité scientifique de l'"International Society on Thrombosis and Haemostasis" (ISTH) a proposé le tableau récapitulatif suivant (Tableau 24), basé sur la détermination des deux rapports : VWF:RCo/VWF:Ag et VWF:CB/VWF:Ag.

**Tableau 24:** Tableau des rapports VWF:RCo/VWF:Ag et VWF:CB/VWF:Ag dans la VWD, proposé par l'ISTH.

	RAPPORTS	
	VWF:RCo/VWF:Ag	VWF:CB/VWF:Ag
<b>VWD de type 1</b>	$> 0,7$	$> 0,7$
<b>VWD de type 2A</b>	$< 0,7$	$< 0,3$
<b>VWD de type 2B</b>	$< 0,7$	$< 0,3$
<b>VWD de type 2M</b>	$< 0,7$	$> 0,7$

**Figure 15:** Algorithme décrivant la prise en charge diagnostique d'une VWD. D'après Fressinaud et Meyer 2004 (Fressinaud et Meyer, 2004).



#### **4. VWF:CB et syndrome de Willebrand acquis:**

Parmi les causes de AVWS, les deux plus fréquentes sont les syndromes myeloprolifératifs et le RAo. Le diagnostic de AVWS est évoqué sur l'apparition tardive d'un syndrome hémorragique, l'absence d'antécédents familiaux, et parfois l'association d'un pic monoclonal d'immunoglobuline à l'immunoélectrophorèse des protéines sériques.

Dans notre étude, nous avons étudié le VWF:CB chez 3 patients atteints de AVWS lié à une MGUS, et 3 patients atteints de AVWS lié à un RAo. Nos résultats nous permettent d'observer une différence entre ces deux populations.

En effet, dans la population MGUS, on retrouve des résultats identiques à ceux que l'on pourrait observer chez un patient avec une VWD de type 2A: rapport VWF:RCo/VWF:Ag  $< 0,7$  et rapport VWF:CB/VWF:Ag  $< 0,3$ .

Le groupe de patients avec un AVWS lié à un RAo a des résultats différents. Il est important de souligner que l'anomalie n'est dépistée ni par le dosage du VWF:RCo ni par celui du VWF:Ag : en effet, les résultats de VWF:RCo et VWF:Ag sont comparables à ceux de la population témoin (tableau 23), avec un rapport VWF:RCo/VWF:Ag  $> 0,7$ . Le diagnostic est évoqué uniquement sur l'allongement du TO sur PFA-100<sup>®</sup>. Par contre les dosages du VWF:CB sont significativement abaissés, avec un rapport VWF:CB/VWF:Ag anormal  $< 0,6$  dans tous les cas. Les manifestations hémorragiques observées chez ces patients sont liées à la perte des multimères de HPM du VWF, à laquelle deux tests sont sensibles: le PFA-100<sup>®</sup> et le VWF:CB. Le mécanisme en cause est une protéolyse accélérée des HPM sur la valve endommagée, avec une corrélation entre la sévérité de la sténose aortique et la baisse du rapport VWF:CB/VWF:Ag. Le changement de la valve permet d'observer une correction rapide des anomalies du VWF dans tous les cas (Vincentelli et al., 2003).

Il serait intéressant d'analyser le VWF:CB chez des patients avec hémorragie digestive liée à des lésions d'angiodysplasie; ce contexte doit conduire à l'exploration du VWF avec la recherche d'anomalies des multimères de HPM, responsables des manifestations hémorragiques (Veyradier et al., 2001a)

## **CONCLUSION**

Le diagnostic biologique de VWD est délicat, et doit faire appel à une "stratégie diagnostique", reposant sur l'utilisation d'un test fonctionnel d'activité du VWF et d'un test antigénique (VWF:Ag). Le test fonctionnel le plus utilisé actuellement est le VWF:RCo. Ce dosage a cependant des limites, en particulier sa faible reproductibilité inter laboratoires et le fait qu'il repose sur un composé non physiologique, la ristocétine. Ce test a cependant l'avantage d'évaluer la capacité du VWF à se lier aux plaquettes. Un autre test fonctionnel a été proposé plus récemment: le VWF:CB, basé sur la capacité des multimères de HPM du VWF à se lier au collagène. Dans certaines situations cependant, les deux tests présentent des discordances qui semblent liées à une meilleure sensibilité du VWF:CB pour détecter les anomalies touchant spécifiquement les multimères de HPM: AVWS et certaines VWD de type 2 (2A et 2B).

Nous avons développé une technique ELISA de dosage du VWF:CB. Notre méthode montre des performances analytiques satisfaisantes mais pourrait être encore améliorée techniquement.

L'étude du VWF:CB est capable d'améliorer la discrimination entre VWD de type 1 et VWD de type 2 (sauf type 2M), et peut être une certaine alternative à l'étude de la distribution des multimères. Il n'est pas réalisable en urgence et en unitaire, et ne peut donc remplacer le VWF:RCo comme cela a été proposé. Il a une meilleure sensibilité que le VWF:RCo dans la pathologie acquise, et quelque soit le résultat des dosages de VWF:RCo et de VWF:Ag, doit être systématiquement réalisé chez les patients avec anomalies du PFA-100<sup>®</sup>, test extrêmement sensible aux anomalies qualitatives du VWF.

En conclusion: le VWF:CB ne doit pas se substituer au VWF:RCo. C'est un test additionnel, particulièrement utile pour la discrimination entre VWD de type 1 et VWD de type 2 (sauf type 2M), particulièrement sensible à la perte des multimères de HPM, ce qui en fait aussi un test performant pour le diagnostic de AVWS.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Arya, M., Anvari, B., Romo, G.M., Cruz, M.A., Dong, J.F., McIntire, L.V., Moake, J.L. et Lopez, J.A. (2002) Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood* 99(11), 3971-7.
- Baronciani, L., Cozzi, G., Canciani, M.T., Peyvandi, F., Srivastava, A., Federici, A.B. et Mannucci, P.M. (2000) Molecular characterization of a multiethnic group of 21 patients with type 3 von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 84(4), 536-40.
- Bonnefoy, A., Yamamoto, H., Thys, C., Kito, M., Vermylen, J. et Hoylaerts, M.F. (2003) Shielding the front-strand beta 3 of the von Willebrand factor A1 domain inhibits its binding to platelet glycoprotein Ibalpha. *Blood* 101(4), 1375-83.
- Bowen, D.J. (2003) An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS13. *J Thromb Haemost* 1(1), 33-40.
- Caron, C., Mazurier, C. et Goudemand, J. (2002) Large experience with a factor VIII binding assay of plasma von Willebrand factor using commercial reagents. *Br J Haematol* 117(3), 716-8.
- Casonato, A., Pontara, E., Bertomoro, A., Sartorello, F., Cattini, M.G. et Girolami, A. (2001) Von Willebrand factor collagen binding activity in the diagnosis of von Willebrand disease: an alternative to ristocetin co-factor activity? *Br J Haematol* 112(3), 578-83.
- Castillo, R., Monteagudo, J., Escolar, G., Ordinas, A., Magallon, M. et Martin Villar, J. (1991) Hemostatic effect of normal platelet transfusion in severe von Willebrand disease patients. *Blood* 77(9), 1901-5.
- Cattaneo, M., Moia, M., Delle Valle, P., Castellana, P. et Mannucci, P.M. (1989) DDAVP shortens the prolonged bleeding times of patients with severe von Willebrand disease treated with cryoprecipitate. Evidence for a mechanism of action independent of released von Willebrand factor. *Blood* 74(6), 1972-5.
- Denis, C.V. (2003) Von Willebrand factor in vascular pathophysiology. *Pathol Biol (Paris)* 51(7), 395-6.
- Di Paola, J., Federici, A.B., Mannucci, P.M., Canciani, M.T., Kritzik, M., Kunicki, T.J. et Nugent, D. (1999) Low platelet alpha2beta1 levels in type I von Willebrand disease correlate with impaired platelet function in a high shear stress system. *Blood* 93(11), 3578-82.
- Emsley, J., Cruz, M., Handin, R. et Liddington, R. (1998) Crystal structure of the von Willebrand Factor A1 domain and implications for the binding of platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 273(17), 10396-401.

- Favaloro, E.J. (2000) Collagen binding assay for von Willebrand factor (VWF:CBA): detection of von Willebrand's Disease (VWD), and discrimination of VWD subtypes, depends on collagen source. *Thromb Haemost* 83(1), 127-35.
- Favaloro, E.J. (2001) Utility of the PFA-100 for assessing bleeding disorders and monitoring therapy: a review of analytical variables, benefits and limitations. *Haemophilia* 7(2), 170-9.
- Favaloro, E.J. (2002a) A duplex issue: (i) time to re-appraise the diagnosis and classification of von Willebrand disorder, and (ii) clarification of the roles of von Willebrand factor collagen binding and ristocetin cofactor activity assays. *Haemophilia* 8(6), 828-31.
- Favaloro, E.J. (2002b) Von Willebrand factor collagen-binding (activity) assay in the diagnosis of von Willebrand disease: a 15-year journey. *Semin Thromb Hemost* 28(2), 191-202.
- Favaloro, E.J., Bonar, R., Kershaw, G., Sioufi, J., Hertzberg, M., Street, A., Lloyd, J. et Marsden, K. (2004) Laboratory diagnosis of von Willebrand's disorder: quality and diagnostic improvements driven by peer review in a multilaboratory test process. *Haemophilia* 10(3), 232-42.
- Favaloro, E.J., Grispo, L., Exner, T. et Koutts, J. (1991) Development of a simple collagen based ELISA assay aids in the diagnosis of, and permits sensitive discrimination between type I and type II, von Willebrand's disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2(2), 285-91.
- Favaloro, E.J., Kershaw, G., Bukuya, M., Hertzberg, M. et Koutts, J. (2001a) Laboratory diagnosis of von Willebrand disorder (vWD) and monitoring of DDAVP therapy: efficacy of the PFA-100 and vWF:CBA as combined diagnostic strategies. *Haemophilia* 7(2), 180-9.
- Favaloro, E.J., Nair, S.C. et Forsyth, C.J. (2001b) Collection and transport of samples for laboratory testing in von Willebrand's disease (VWD): time for a reappraisal? *Thromb Haemost* 86(6), 1589-90.
- Federici, A.B., Mazurier, C., Berntorp, E., Lee, C.A., Scharrer, I., Goudemand, J., Lethagen, S., Nitu, I., Ludwig, G., Hilbert, L. et Mannucci, P.M. (2003) Biological response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: results of a multicenter European study. *Blood*.
- Federici, A.B., Stabile, F., Castaman, G., Canciani, M.T. et Mannucci, P.M. (1998) Treatment of acquired von Willebrand syndrome in patients with monoclonal gammopathy of uncertain significance: comparison of three different therapeutic approaches. *Blood* 92(8), 2707-11.
- Fressinaud, E., Baruch, D., Girma, J.P., Sakariassen, K.S., Baumgartner, H.R. et Meyer, D. (1988) von Willebrand factor-mediated platelet adhesion to collagen involves platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa as well as glycoprotein Ib. *J Lab Clin Med* 112(1), 58-67.

- Fressinaud, E. et Meyer, D. (1995) La maladie de Willebrand: du diagnostic au traitement. *Hématologie* 3, 199-208.
- Fressinaud, E. et Meyer, D. (2001) Maladie de Willebrand, *Encycl Méd Chir, Hématologie*.
- Fressinaud, E. et Meyer, D. (2004) Von Willebrand disease: biological diagnosis, *Text book of Hemophilia*, Vol. Chapitre 46, Blackwell Publishing, pp. 306-312.
- Fressinaud, E., Veyradier, A., Truchaud, F., Martin, I., Boyer-Neumann, C., Trossaert, M. et Meyer, D. (1998) Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases. *Blood* 91(4), 1325-31.
- Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L.Z., Roberts, J.R., Kostel, P., Ruggeri, Z.M. et Zimmerman, T.S. (1987) A heparin-binding domain of human von Willebrand factor. Characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val-449 to Lys-728. *J Biol Chem* 262(4), 1734-9.
- Furlan, M., Robles, R. et Lamie, B. (1996) Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 87(10), 4223-34.
- Gill, J.C., Endres-Brooks, J., Bauer, P.J., Marks, W.J., Jr. et Montgomery, R.R. (1987) The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 69(6), 1691-5.
- Goodeve, A.C., Eikenboom, J.C., Ginsburg, D., Hilbert, L., Mazurier, C., Peake, I.R., Sadler, J.E. et Rodeghiero, F. (2001) A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms. On behalf of the ISTH SSC Subcommittee on von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 85(5), 929-31.
- Goto, S., Salomon, D.R., Ikeda, Y. et Ruggeri, Z.M. (1995) Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets. *J Biol Chem* 270(40), 23352-61.
- Hamidou, M., Agard, C., Fressinaud, E., Fiks-Sigaud, M., Rapp, M.J., Grolleau, J.Y. et Harousseau, J.L. (1997) [Acquired Willebrand syndrome with lymphoproliferative disorders]. *Presse Med* 26(1), 12-4.
- Hashemi, S., Palmer, D.S., Aye, M.T. et Ganz, P.R. (1993) Platelet-activating factor secreted by DDAVP-treated monocytes mediates von Willebrand factor release from endothelial cells. *J Cell Physiol* 154, 496-505.
- Huizinga, E.G., Martijn van der Plas, R., Kroon, J., Sixma, J.J. et Gros, P. (1997) Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding. *Structure* 5(9), 1147-56.
- Huizinga, E.G., Tsuji, S., Romijn, R.A., Schiphorst, M.E., de Groot, P.G., Sixma, J.J. et Gros, P. (2002) Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science* 297(5584), 1176-9.

- Ingerslev, J. (1987) A sensitive ELISA for von Willebrand factor (vWf:Ag). *Scand J Clin Lab Invest* 47(2), 143-9.
- Kobe, B. et Kajava, A.V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11(6), 725-32.
- Laffan, M., Brown, S.A., Collins, P.W., Cumming, A.M., Hill, F.G., Keeling, D., Peake, I.R. et Pasi, K.J. (2004) The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 10(3), 199-217.
- Macfarlane, D.E., Stibbe, J., Kirby, E.P., Zucker, M.B., Grant, R.A. et McPherson, J. (1975) Letter: A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). *Thromb Diath Haemorrh* 34(1), 306-8.
- Maita, N., Nishio, K., Nishimoto, E., Matsui, T., Shikamoto, Y., Morita, T., Sadler, J.E. et Mizuno, H. (2003) Crystal structure of von Willebrand factor A1 domain complexed with snake venom, bitiscetin: insight into glycoprotein I $\alpha$  binding mechanism induced by snake venom proteins. *J Biol Chem* 278(39), 37777-81.
- Mancuso, D.J., Tuley, E.A., Westfield, L.A., Worrall, N.K., Shelton-Inloes, B.B., Sorace, J.M., Alevy, Y.G. et Sadler, J.E. (1989) Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 264(33), 19514-27.
- Mannucci, P.M. (2001) How I treat patients with von Willebrand disease. *Blood* 97(7), 1915-9.
- Mannucci, P.M. et Cattaneo, M. (1991) Alloantibodies in congenital von Willebrand's disease. *Ric Clin Lab* 21(1), 119-25.
- Mannucci, P.M. et Federici, A.B. (2001) Management of inherited von Willebrand disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2), 455-62.
- Mannucci, P.M., Lombardi, R., Bader, R., Vianello, L., Federici, A.B., Solinas, S., Mazzucconi, M.G. et Mariani, G. (1985) Heterogeneity of type I von Willebrand disease: evidence for a subgroup with an abnormal von Willebrand factor. *Blood* 66(4), 796-802.
- Mannucci, P.M., Ruggeri, Z.M., Ciavarella, N., Kazatchkine, M.D. et Mowbray, J.F. (1981) Precipitating antibodies to factor VIII/von Willebrand factor in von Willebrand's disease: effects on replacement therapy. *Blood* 57(1), 25-31.
- Mannucci, P.M., Ruggeri, Z.M., Pareti, F.I. et Capitano, A. (1977) 1-Deamino-8-d-arginine vasopressin: a new pharmacological approach to the management of haemophilia and von Willebrand's diseases. *Lancet* 1, 869-872.
- Matsushita, T., Meyer, D. et Sadler, J.E. (2000) Localization of von willebrand factor-binding sites for platelet glycoprotein Ib and botrocetin by charged-to-alanine scanning mutagenesis. *J Biol Chem* 275(15), 11044-9.

- Matsushita, T. et Sadler, J.E. (1995) Identification of amino acid residues essential for von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib. Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the A1 domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 270(22), 13406-14.
- Meyer, D., Fressinaud, E., Hilbert, L., Ribba, A.S., Lavergne, J.M. et Mazurier, C. (2001) Type 2 von Willebrand disease causing defective von Willebrand factor-dependent platelet function. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2), 349-64.
- Meyer, D., Fressinaud, E. et Mazurier, C. (1998) Groupe de travail sur le diagnostic biologique de la maladie de Willebrand. Réunion de travail GEHT.
- Meyer, D., Obert, B., Pietu, G., Lavergne, J.M. et Zimmerman, T.S. (1980) Multimeric structure of factor VIII/von Willebrand factor in von Willebrand's disease. *J Lab Clin Med* 95(4), 590-602.
- Miller, C.H., Platt, S.J., Daniele, C. et Kaczor, D. (2002) Evaluation of two automated methods for measurement of the ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 88(1), 56-9.
- Miller, J.L., Cunningham, D., Lyle, V.A. et Finch, C.N. (1991) Mutation in the gene encoding the alpha chain of platelet glycoprotein Ib in platelet-type von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11), 4761-5.
- Miller, M.A., Palascak, J.E., Thompson, M.R. et Martelo, O.J. (1985) A modified SDS agarose gel method for determining factor VIII von Willebrand factor multimers using commercially available reagents. *Thromb Res* 39(6), 777-80.
- Mohri, H., Motomura, S., Kanamori, H., Matsuzaki, M., Watanabe, S., Maruta, A., Kodama, F. et Okubo, T. (1998) Clinical significance of inhibitors in acquired von Willebrand syndrome. *Blood* 91(10), 3623-9.
- Murdock, P.J., Woodhams, B.J., Matthews, K.B., Pasi, K.J. et Goodall, A.H. (1997) von Willebrand factor activity detected in a monoclonal antibody-based ELISA: an alternative to the ristocetin cofactor platelet agglutination assay for diagnostic use. *Thromb Haemost* 78(4), 1272-7.
- Nishino, M., Girma, J.P., Rothschild, C., Fressinaud, E. et Meyer, D. (1989) New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* 74(5), 1591-9.
- Obert, B., Houllier, A., Meyer, D. et Girma, J.P. (1999a) Conformational changes in the A3 domain of von Willebrand factor modulate the interaction of the A1 domain with platelet glycoprotein Ib. *Blood* 93(6), 1959-68.
- Obert, B., Tout, H., Veyradier, A., Fressinaud, E., Meyer, D. et Girma, J.P. (1999b) Estimation of the von Willebrand factor-cleaving protease in plasma using monoclonal antibodies to vWF. *Thromb Haemost* 82(5), 1382-5.

- O'Brien, L.A., James, P.D., Othman, M., Berber, E., Cameron, C., Notley, C.R., Hegadorn, C.A., Sutherland, J.J., Hough, C., Rivard, G.E., O'Shaunessey, D. et Lillicrap, D. (2003) Founder von Willebrand factor haplotype associated with type 1 von Willebrand disease. *Blood* 102(2), 549-57.
- Peake, I.R., Bowen, D., Bignell, P., Liddell, M.B., Sadler, J.E., Standen, G. et Bloom, A.L. (1990) 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* 76(3), 555-61.
- Pittet, J.L., Barbalat, V., Sanvert, M., Villard, C., Jorieux, S. et Mazurier, C. (1997) Evaluation of a new automated ELISA test for von Willebrand factor using two monoclonal antibodies. *Blood Coag Fibrinolysis* 8(4), 209-15.
- Ribba, A.N., Hilbert, L., Lavergne, J.M., Fressinaud, E., Boyer-Neumann, C., Ternisien, C., Juhan-Vague, I., Goudemand, J., Girma, J., Mazurier, C. et Meyer, D. (2001) The arginine-552-cysteine (R1315C) mutation within the A1 loop of von Willebrand factor induces an abnormal folding with a loss of function resulting in type 2A-like phenotype of von Willebrand disease: study of 10 patients and mutated recombinant von Willebrand factor. *Blood* 97(4), 952-9.
- Rodeghiero, F. (2002) von Willebrand disease: still an intriguing disorder in the era of molecular medicine. *Haemophilia* 8(3), 292-300.
- Rodeghiero, F., Castaman, G. et Dini, E. (1987) Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 69(2), 454-9.
- Rodeghiero, F., Castaman, G.C., Toso, A., Lattuada, A. et Mannucci, P.M. (1990) Platelet von Willebrand factor assay: results using two methods for platelet lysis. *Thromb Res* 59(2), 259-67.
- Rodgers, R.P. et Levin, J. (1990) A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 16(1), 1-20.
- Romani de Wit T. et van Mourik J. (2001) Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Practice and Research in Haematology* 14, 241-255.
- Romijn, R.A., Westein, E., Bouma, B., Schiphorst, M.E., Sixma, J.J., Lenting, P.J. et Huizinga, E.G. (2003) Mapping the collagen-binding site in the von Willebrand factor-A3 domain. *J Biol Chem* 278(17), 15035-9.
- Ruggeri, Z.M. (2001) Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(2), 257-79.
- Ruggeri(1), Z.M. (2003) Von Willebrand factor. *Curr Opin Hematol* 10(2), 142-9.
- Ruggeri(2), Z.M. (2003) Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 1(7), 1335-42.

- Russell, S.D. et Roth, G.J. (1993) Pseudo-von Willebrand disease: a mutation in the platelet glycoprotein Ib alpha gene associated with a hyperactive surface receptor. *Blood* 81(7), 1787-91.
- Sadler, J.E. (1994) A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 71(4), 520-5.
- Sadler, J.E. (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 67, 395-424.
- Sadler, J.E. (2002) Biomedicine. Contact--how platelets touch von Willebrand factor. *Science* 297(5584), 1128-9.
- Sadler, J.E. (2003) Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood* 101(6), 2089-93.
- Sadler, J.E., Mannucci, P.M., Berntorp, E., Bochkov, N., Boulyjenkov, V., Ginsburg, D., Meyer, D., Peake, I., Rodeghiero, F. et Srivastava, A. (2000) Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 84(2), 160-74.
- Schneppenheim, R., Federici, A.B., Budde, U., Castaman, G., Drewke, E., Krey, S., Mannucci, P.M., Riesen, G., Rodeghiero, F., Zieger, B. et Zimmermann, R. (2000) Von Willebrand Disease type 2M "Vicenza" in Italian and German patients: identification of the first candidate mutation (G3864A; R1205H) in 8 families. *Thromb Haemost* 83(1), 136-40.
- Schneppenheim, R., Plendl, H. et Budde, U. (1988) Luminography--an alternative assay for detection of von Willebrand factor multimers. *Thromb Haemost* 60(2), 133-6.
- Siedlecki, C.A., Lestini, B.J., Kottke-Marchant, K.K., Eppell, S.J., Wilson, D.L. et Marchant, R.E. (1996) Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 88(8), 2939-50.
- Siekman, J., Turecek, P.L. et Schwarz, H.P. (1998) The determination of von Willebrand factor activity by collagen binding assay. *Haemophilia* 4 Suppl 3, 15-24.
- Stewart, M., Etches, W., Shaw, A. et Gordon, P. (1997) VWF inhibitor detection by competitive ELISA. *J Immunol Methods* 200, 113-119.
- Takahashi, Y., Kalafatis, M., Girma, J.P., Sewerin, K., Andersson, L.O. et Meyer, D. (1987) Localization of a factor VIII binding domain on a 34 kilodalton fragment of the N-terminal portion of von Willebrand factor. *Blood* 70(5), 1679-82.
- Tsai, H.M. (1996) Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 87(10), 4235-44.

- Turecek, P.L., Siekmann, J. et Schwarz, H.P. (2002) Comparative study on collagen-binding enzyme-linked immunosorbent assay and ristocetin cofactor activity assays for detection of functional activity of von Willebrand factor. *Semin Thromb Hemost* 28(2), 149-60.
- Vanhoorelbeke, K., Cauwenberghs, N., Vauterin, S., Schlamadinger, A., Mazurier, C. et Deckmyn, H. (2000) A reliable and reproducible ELISA method to measure ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 83(1), 107-13.
- Veyradier, A., Balian, A., Wolf, M., Giraud, V., Montembault, S., Obert, B., Dagher, I., Chaput, J.C., Meyer, D. et Naveau, S. (2001a) Abnormal von Willebrand factor in bleeding angiodysplasias of the digestive tract. *Gastroenterology* 120(2), 346-53.
- Veyradier, A., Fressinaud, E. et Meyer, D. (1998) Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Int J Clin Lab Res* 28(4), 201-10.
- Veyradier, A., Fressinaud, E., Sigaud, M., Wolf, M. et Meyer, D. (1999) [Evaluation of a new automated method for von Willebrand factor antigen measurement: the STA-Liatest vWF]. *Ann Biol Clin (Paris)* 57(3), 364-8.
- Veyradier, A., Jenkins, C.S., Fressinaud, E. et Meyer, D. (2000) Acquired von Willebrand syndrome: from pathophysiology to management. *Thromb Haemost* 84(2), 175-82.
- Veyradier, A., Obert, B., Houllier, A., Meyer, D. et Girma, J.P. (2001b) Specific von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases. *Blood* 98(6), 1765-72.
- Vincentelli, A., Susen, S., Le Tourneau, T., Six, I., Fabre, O., Juthier, F., Bauters, A., Decoene, C., Goudemand, J., Prat, A. et Jude, B. (2003) Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N Engl J Med* 349(4), 343-9.
- von Willebrand, E. (1926) Hereditär pseudohemofili. *Fin Laekaresaellsk Hand* 68, 87-112.
- Weiss, H., Meyer, D., Rabinowitz, R., Pietu, G., Girma, J.P., Vicic, W.J. et Rogers, J. (1982) Pseudo-von Willebrand's disease. An intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high-molecular-weight multimers. *N. Engl. J. Med.* 306, 326-333.
- Wright, R.D. et Krauss, J.S. (1990) A comparison of two macroscopic platelet agglutination assays for von Willebrand factor. *Ann Clin Lab Sci* 20(1), 73-8.

**NOM : BETTEMBOURG**

**PRENOM : Armelle**

**Titre de Thèse : Intérêt de l'étude de la liaison du facteur Willebrand au collagène (VWF:CB) : étude chez 49 patients.**

---

## **RESUME**

Le facteur Willebrand (VWF) est une glycoprotéine qui joue un rôle primordial dans l'interaction des plaquettes avec le sous-endothélium vasculaire et dans le transport du facteur VIII. La maladie de Willebrand (VWD) résulte d'une anomalie quantitative ou qualitative du VWF. Notre travail consiste à évaluer l'intérêt et la place d'un nouveau test fonctionnel basé sur la capacité de liaison du VWF au collagène (VWF:CB). Des dosages de VWF:CB ont été réalisés chez 20 sujets normaux et chez 49 patients atteints de VWD et suivis au CHU de Nantes. Nous comparons nos résultats à ceux de la littérature. Nous concluons que sa grande sensibilité à l'absence des multimères de haut poids moléculaire du VWF en fait un test complémentaire utile pour la discrimination entre un déficit quantitatif et un déficit qualitatif lié à une répartition anormale des multimères. Ainsi, il peut permettre d'améliorer le type de VWD, sans avoir recours à des tests très spécialisés et de réalisation plus difficile.

---

## **MOTS-CLES**

Facteur Willebrand (VWF)

Maladie de Willebrand (VWD)

Capacité de liaison du facteur Willebrand au collagène (VWF:CB)

Multimères du facteur Willebrand