

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2011

N° 47

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE
(Spécialité Génétique Moléculaire)**

Conformément aux dispositions du décret 2003-76
du 23 Janvier 2003, tient lieu de

**THÈSE
POUR LE
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

Par

Céline Garrec

Née le 02/05/1982 à Ploemeur

Présentée et soutenue publiquement le 16 Juin 2011

Recherche de mutations du gène ADAMTS13
dans deux cohortes de patients suspects
de Syndrome d'Upschaw-Schulman

Président : Madame le Professeur Agnès Veyradier

Directeur de Thèse : Monsieur le Professeur Stéphane Bézieau

SOMMAIRE

I. Purpura Thrombotique Thrombocytopénique (PTT), physiopathologie et étiologies....	7
A. Le PTT est une microangiopathie thrombotique (MAT)	7
B. Le PTT : caractéristiques clinico-biologiques.....	9
1. Epidémiologie	9
2. Clinique.....	9
3. Biologie.....	10
4. Histologie.....	11
C. Physiopathologie.....	12
1. Historique.....	12
2. Le facteur de von Willebrand (VWF)	13
3. Les mégamultimères de VWF et le rôle d'ADAMTS13	15
4. ADAMTS13.....	17
a) Les familles ADAM et ADAMTS	17
b) Le gène.....	18
c) Protéine ADAMTS13.....	19
(1) Structure	19
(2) Fonction : le clivage des multimères de VWF.....	20
D. Diagnostic.....	23
1. Mesure de l'activité ADAMTS13	23
2. Etiologique :.....	24
a) Auto-immune	24
b) Altération constitutionnelle de la protéase : syndrome d'Upshaw-Schulman ou PTT congénital	25
(1) Présentation clinico-biologique	26
(2) Variants décrits.....	27
E. Traitement.....	29
1. PTT acquis d'origine auto-immune	29
2. Syndrome d'Upshaw-Schulman.....	30
II. But du travail : projet de séquençage du gène ADAMTS13 chez des patients suspects de PTT héréditaire	31
III. Matériel et méthodes	32
A. Recrutement des patients.....	32
B. Tests biochimiques effectués à l'hôpital Antoine Bécclère de Clamart et à l'Unité Inserm U770, Le Kremlin Bicêtre.....	32
1. Mesure de l'activité ADAMTS13	32
2. Antigène ADAMTS13	33
3. Recherche d'une activité inhibitrice circulante	33
4. Recherche et titrage d'IgG anti-ADAMTS13	34
C. Séquençage du gène ADAMTS13	34
1. Extraction de l'ADN	34
2. PCR (Polymérase Chain réaction)	34
3. Le séquençage.....	38
IV. Résultats.....	40
A. PTT révélés dans l'enfance.....	40
1. Epidémiologie et clinique	40
2. Résultats du séquençage des exons et jonctions introns-exons du gène ADAMTS13	42

B.	Cohorte de patients avec PTT révélé à l'âge adulte	50
1.	Epidémiologie et clinique	50
2.	Résultats du séquençage des exons et jonctions introns-exons du gène ADAMTS13	53
V.	DISCUSSION.....	58
A.	Etude de l'effet délétère des variants retrouvés.....	58
1.	Cohorte de patients avec PTT révélé pendant l'enfance	58
a)	Mutation décrites dans la littérature	58
b)	Mutations non décrites dans la littérature.....	60
c)	Polymorphismes	65
2.	Cohorte de patients avec PTT révélé à l'âge adulte	69
a)	Mutations décrites dans la littérature.....	69
b)	Mutations non décrites dans la littérature.....	70
c)	Polymorphismes modulateurs	72
B.	Relation génotype-phénotype	73
1.	PTT révélés dans l'enfance	73
2.	PTT révélé à l'âge adulte	74
C.	Comment expliquer le tableau clinique des patients qui ne présentent qu'une seule mutation hétérozygote ou aucune mutation.	75
1.	La patiente A5.....	75
a)	Grand réarrangement : délétion.....	75
b)	Isodisomie parentale du chromosome 9	77
2.	Les patientes A4 et A9	78
3.	Le patient P14	78
a)	Anomalies dans des séquences non codantes	79
(1)	Région 5'UTR	79
(2)	Les introns	79
(3)	Régions régulatrices à distance.....	79
b)	Polymorphismes du VWF	80
VI.	CONCLUSION.....	81
VII.	BIBLIOGRAPHIE.....	82

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Schizocytes	10
Figure 2 : Thrombus plaquettaire dans une artériole du myocarde (coloration hématoxyline- éosine)	11
Figure 3 : Analyse par technique de western blot des multimères de VWF chez un patient atteint de PTT et un individu témoin.....	12
Figure 4 : Pré-pro-VWF et domaines de fixation de plusieurs protéines	14
Figure 5 : Formation des multimères de VWF.....	14
Figure 6 : Clivage des multimères de VWF	16
Figure 7 : Le plasma de patients atteints de PTT ne clive pas les chapelets de mégamultimères de VWF avec des plaquettes adhérentes	18
Figure 8 : Schéma représentant la structure des protéases des familles ADAM et ADAMTS	17
Figure 9: Schéma de la protéase ADAMTS13	18
Figure 10 : northern blot d'ARN provenant de plusieurs tissus humains	18
Figure 11 : Structure d'ADAMTS13	19
Figure 12 : Activité ADAMTS13 de la protéase complète et des variants tronqués	21
Figure 13 : Schéma structural d'ADAMTS13	22
Figure 14 : Modèle de liaison d'ADAMTS13 aux multimères de VWF en 2 étapes	22
Figure 15: Mutations et polymorphismes non-sens décrits dans la littérature internationale...31	
Figure 16: Variants retrouvés chez les patients atteints de PTT révélé pendant l'enfance.....	45
Figure 17: Arbres généalogiques des patients atteints de PTT durant l'enfance	46
Figure 18: Variants retrouvés chez les patients atteints de PTT révélé à l'âge adulte.....	55
Figure 19: Arbres généalogiques des patients atteints de PTT révélé à l'âge adulte.....	56
Figure 20: Arbre généalogique de la famille du patient P23.....	65
Figure 21: Arbre généalogique de la famille de la patiente A5	76

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des MAT en fonction de leur physiopathologie	8
Tableau 2: Amorces utilisées	36
Tableau 3: Concentrations finales des mix de PCR pour tous les exons (excepté les 7 et 8) ..	37
Tableau 4: Concentrations finales des mix de PCR des exons 7 et 8.....	37
Tableau 5: Programmes d'amplification des PCR.....	37
Tableau 6: Programme de la réaction de séquence	38
Tableau 7 : Epidémiologie, signes cliniques et biologiques des patients atteints de PTT à révélation dans l'enfance.....	41
Tableau 8: Variants des exons et jonctions intron-exon du gène ADAMTS13 dans la cohorte de cas pédiatriques	43
Tableau 9: Epidémiologie et clinique des patients avec PTT révélés à l'âge adulte	51
Tableau 10 : Variants retrouvés chez patients avec révélation du PTT à l'âge adulte	54
Tableau 11: Mutations de la cohorte de patients atteints de PTT durant l'enfance, décrites dans la littérature internationale	59
Tableau 12: Conséquences probables des mutations non-sens, des duplications et des mutations d'épissage retrouvées.....	61
Tableau 13 : Logiciels de prédiction de l'effet des variants faux-sens	62
Tableau 14: Variants faux-sens et conséquences prédites par bioinformatique.....	63
Tableau 15 : Antigène et activité ADAMTS13 obtenus dans le milieu des cellules exprimant des variants.....	66
Tableau 16: Polymorphismes non-synonymes de la cohorte de PTT révélés pendant l'enfance	68
Tableau 17: Mutations de la cohorte de patients avec PTT révélé à l'âge adulte décrites dans la littérature	69
Tableau 18: Mutations non-sens et décalage du cadre de lecture non décrits dans la littérature dans la cohorte de patients avec PTT révélé à l'âge adulte	70
Tableau 19: Variants faux-sens non décrits dans la littérature, dans la cohorte de patients avec PTT révélé à l'âge adulte	71

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADAM : *a disintegrin and metalloproteinase*
- ADAMTS13: *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeats*
- ADN: acide désoxyribonucléique
- ARN: acide ribonucléique
- ARNm : ARN messenger
- AVC : accident vasculaire cérébral
- BAV : bloc atrio-ventriculaire
- dNTP : désoxyribonucléotides tri-phosphates
- EDTA: acide éthylène diamine tetra acétique
- EGF : *epidermal growth factor*
- ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
- EP: échanges plasmatiques
- FRET : *fluorescence resonance energy transfert*
- GP: glycoprotéine
- HELLP syndrome : *hemolysis-elevated liver enzymes and low platelets syndrome*
- Ig : immunoglobuline
- LDH: lactate déshydrogénase
- MAT : microangiopathie trombotique
- NMD : *non-sens mediated mRNA decay*
- PCR : *polymerase chain reaction*
- PTT : purpura thrombotique thrombocytopénique
- SHU : syndrome hémolytique et urémique
- TNF : tumor necrosis factor
- TSP1 : *thrombospondin type 1 repeats*
- VIH: virus de l'immunodéficience humaine
- VWF : facteur de von Willebrand

I. Purpura Thrombotique Thrombocytopénique (PTT), physiopathologie et étiologies

A. Le PTT est une microangiopathie thrombotique (MAT)

Le terme de microangiopathie thrombotique (MAT) définit plusieurs affections graves, caractérisées par l'association d'une anémie hémolytique mécanique, d'une thrombopénie de consommation et de défaillances d'organe de sévérité variable, ces manifestations étant secondaires à la formation de thrombi dans la microcirculation¹. En effet, les thrombi étant constitués en partie de plaquettes agrégées, il apparaît une thrombopénie de consommation, et, par l'augmentation des forces de cisaillement intravasculaires, une fragmentation des hématies créant une anémie hémolytique mécanique avec présence de schizocytes² (Figure 1). Les défaillances d'organes sont générées par l'ischémie d'aval.

Les MAT comprennent plusieurs entités clinico-biologiques, dont les principales sont le PTT et le SHU (syndrome hémolytique et urémique). Ces deux pathologies, ayant un spectre clinique assez proche et une base physiopathologique ignorée jusqu'à récemment, étaient parfois confondues et regroupées sous le même terme général PTT/SHU. Cependant, la clinique du SHU semble classiquement dominée par l'atteinte rénale, tandis que le PTT se caractérise par la présence d'anomalies neurologiques³. Toutefois, les deux entités peuvent se présenter avec des anomalies neurologiques et rénales, ou aucune des deux⁴.

Récemment, les mécanismes physiopathologiques de ces pathologies ont été identifiés et, pour certains auteurs, font évoluer la classification nosologique de ces maladies, en la fondant non plus sur la clinique seule mais aussi sur leur étiologie (Tableau 1). Ainsi, le PTT est causé par la perte de fonction d'ADAMTS13 (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeats*), une métalloprotéase qui clive les multimères de haut poids moléculaire du facteur de von Willebrand (VWF). Le SHU a plusieurs mécanismes étiologiques: il peut être secondaire à une infection par *Escherichia coli* producteur de *Shiga-like* toxine, à une infection à pneumocoque par activation de l'antigène de Thomsen Friedenreich, ou à des anomalies acquises ou héréditaires de la régulation du complément⁵.

Par ailleurs, il existe des syndromes de MAT associés à différentes pathologies ou à des traitements, sans que le mécanisme physiopathologique ne soit clairement élucidé, qui sont qualifiés par certains auteurs de « *PTT-like disease* »^{1,6,7,8}. Ces situations pathologiques, potentiellement associées à un syndrome de MAT, sont des cancers métastasés, l'infection par le VIH, l'hypertension artérielle maligne, le syndrome catastrophique des antiphospholipides, le HELLP syndrome (*hemolysis-elevated liver enzymes and low platelets syndrome*), les traitements comme l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, les inhibiteurs de calcineurine...

<p>Déficit sévère en ADAMTS13 (PTT)</p> <ul style="list-style-type: none"> Déficit héréditaire Déficits acquis idiopathiques Déficits acquis associés à un contexte particulier <ul style="list-style-type: none"> Infection VIH Antiagrégants plaquettaires (ticlopidine, clopidogrel) Cancers Grossesse <p>Activité ADAMTS13 détectable (SHU)</p> <ul style="list-style-type: none"> SHU + bactérie entéropathogène SHU atypique + <i>S. pneumoniae</i> SHU atypique + dysfonction du complément <ul style="list-style-type: none"> Mutations : facteur H, CFHR, facteur I, MCP/CD46, facteur B, C3, thrombomoduline Gènes de fusion entre le facteur H et CFHR1 Autoanticorps : anticorps antifacteur H SHU atypique + anomalies du métabolisme des cobalamines <p>Activité ADAMTS13 détectable (autres)</p> <ul style="list-style-type: none"> Autres syndromes de MAT <ul style="list-style-type: none"> + VIH (souvent au stade sida) + Cancer (souvent disséminé) + Maladies systémiques + Médicaments « idiopathiques » HELLP Syndrome <ul style="list-style-type: none"> + sVEGF-R1, sEndogline, dysfonction du complément HTA maligne, SCAP, TIH de type II, MVO, CIVD sévère
<p>Abréviations: ADAMTS13 : <i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeats</i> ; PTT : purpura thrombotique thrombocytopénique ; SHU : syndrome hémolytique et urémique ; MAT : microangiopathie thrombotique ; VIH : virus de l'immuno-déficience humaine ; CFHR : <i>complement factor H related</i> ; C3 : fraction C3 du complément ; sVEGF-R1 : récepteur soluble du VEGF (<i>vascular-endothelium growth factor</i>) ; SCAP : syndrome catastrophique des antiphospholipides ; MVO : maladies veino-occlusives ; CIVD : coagulation intravasculaire disséminée ; sEndogline : endogline soluble.</p>

Tableau 1 : Classification des MAT en fonction de leur physiopathologie (d'après Coppo *et al.* 2011⁹)

B. Le PTT : caractéristiques clinico-biologiques

1. Epidémiologie

Le PTT est une pathologie rare, dont l'incidence est d'environ 4 cas par million d'habitants par an^{1, 10}. Il s'agit d'une affection grave engageant le pronostic vital, avec un taux de mortalité spontanée de 90 %, l'instauration du traitement par échanges plasmatiques ayant diminué le taux de mortalité aux alentours de 20 %^{11, 12}.

2. Clinique

Le purpura thrombotique thrombocytopénique a été décrit pour la première fois par Eli Moschowitz en 1924¹³, qui présente le cas d'une jeune fille de 16 ans avec fièvre, anémie hémolytique, pétéchies, insuffisance rénale aiguë, rapidement suivies de paralysie, coma et décès. Classiquement, le diagnostic de PTT repose sur l'association de 5 signes cardinaux: thrombopénie, anémie hémolytique, anomalies neurologiques, rénales, et fièvre¹⁴. Cependant, tous ces signes ne seraient présents que chez 40% des patients¹⁵, et le diagnostic de PTT doit être évoqué devant une thrombopénie et une anémie associées à une défaillance d'organe²³.

En effet, la fièvre est inconstante^{1,8,12} et modérée. L'atteinte neurologique est présente dans la majorité des cas, de 59 %¹⁶, jusqu'à 74%⁸ voire 90 % des cas¹. Le tableau neurologique clinique peut être d'emblée sévère, avec des crises convulsives, des déficits neurologiques focaux, des troubles de la conscience, pouvant aller jusqu'au coma. Les signes cliniques neurologiques sont parfois plus modérés, avec des céphalées et une confusion transitoire^{1,8, 16}. L'atteinte rénale est en général plus modérée qu'au cours du SHU: il est possible d'observer une protéinurie inférieure à 3g/24 heures, une hématurie¹, une augmentation modérée du taux de créatinine plasmatique avec une médiane d'environ 100 $\mu\text{mol/L}$ ^{8,12,17}.

D'autres manifestations peuvent survenir, en rapport avec la localisation des microthrombi artériolaires : des symptômes tels que douleurs abdominales, vomissements, témoignent de l'atteinte digestive^{1,4}, une atteinte pancréatique peut également apparaître, ainsi que des anomalies cardiaques avec des douleurs thoraciques et des troubles de la repolarisation cardiaque^{1,17}, et des atteintes pulmonaires.

La fréquence du syndrome hémorragique, avec purpura ou saignements diffus (viscéral, cérébro-méningé) est difficile à estimer. L'asthénie souvent évoquée est associée au syndrome anémique.

3. Biologie

Sur le plan biologique, il existe une anémie hémolytique mécanique, en général assez importante (médiane du taux d'hémoglobine à 7,3 g/dL⁸, médiane du taux d'hématocrite à 21 %¹⁶). Il s'agit d'une anémie régénérative avec un taux de réticulocytes élevé $\geq 120 \times 10^9/L$, mais qui peut s'élever quelques jours après l'apparition de l'anémie¹⁸. Elle est en général normocytaire, normochrome, accompagnée d'un taux d'haptoglobine sérique effondré, d'une hyperbilirubinémie libre, et d'une augmentation des taux sériques de LDH. Le caractère mécanique de l'hémolyse est affirmé par la présence sur les frottis sanguins de schizocytes (Figure 1), qui sont des fragments d'hématies qui se sont « brisées » sur un obstacle, ici les microthrombi. Il faut noter que les schizocytes peuvent se sphériser après fragmentation, pour former des « schizo-sphérocytes », de petite taille¹⁸.

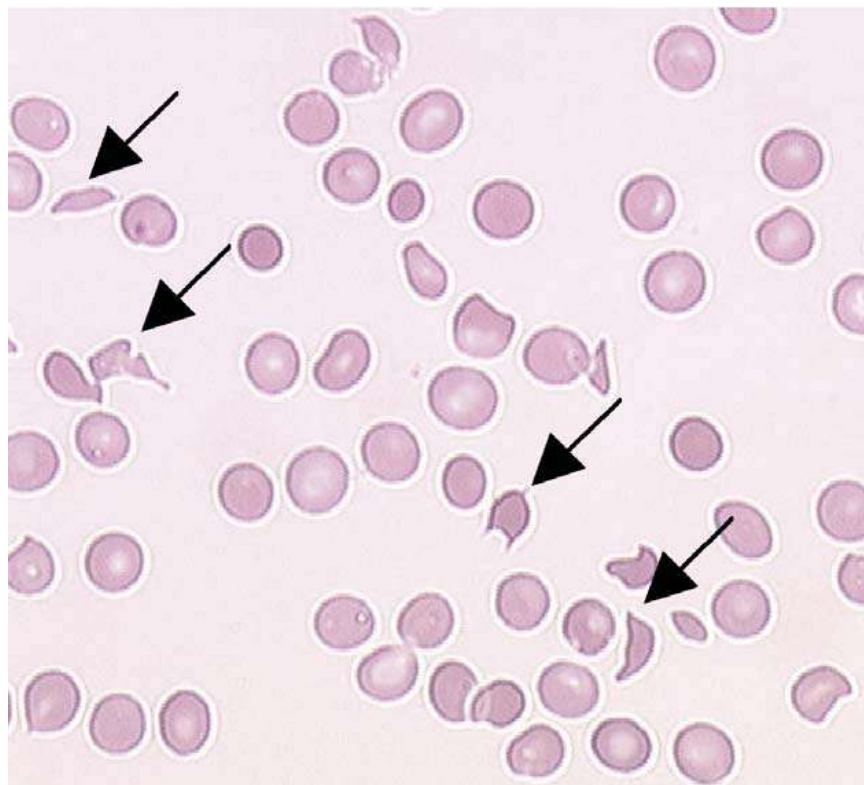


Figure 1: Schizocytes (d'après Coppo *et al.* 2005²⁴)

Il peut être utile de répéter les prélèvements sanguins car les schizocytes peuvent être absents dans les 24 à 48 premières heures d'évolution^{18,19}. Le test de Coombs érythrocytaire direct, s'il est réalisé, est négatif, et élimine ainsi une anémie hémolytique auto-immune.

La thrombopénie est périphérique, liée à la consommation des plaquettes par la constitution des microthrombi. Elle est constante¹, et assez importante avec des médianes inférieures à 20 Giga/L dans plusieurs cohortes de patients^{8,16,20}. L'hémostase est le plus souvent normale, même si une légère augmentation des D-dimères est possible¹.

En ce qui concerne la fonction rénale, l'augmentation de la créatininémie est en général modérée, avec possiblement une hématurie et/ou une protéinurie¹⁷.

4. Histologie

Des autopsies réalisées sur des patients décédés d'un PTT ont permis de constater la présence de thrombi artériolaires et capillaires dans de nombreux organes, dont le cœur (Figure 2), le cerveau, les reins, le pancréas, les surrénales, la rate..

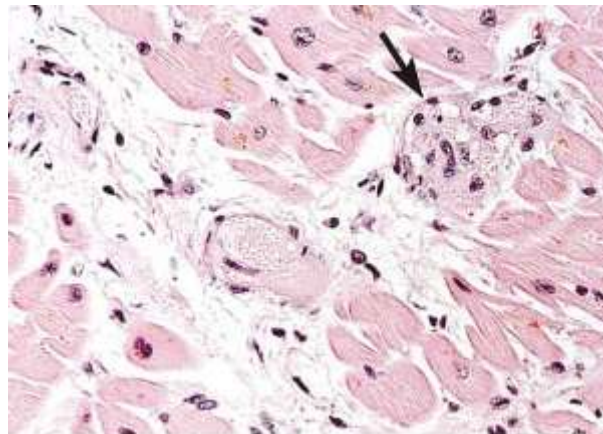


Figure 2 : Thrombus plaquettaire dans une artériole du myocarde (coloration hématoxyline-éosine) d'après Hosler *et al.* 2003²¹

Au cours du PTT, les thrombi sont riches en plaquettes et pauvres en fibrine (alors qu'au cours d'un SHU ils sont riches en fibrine), et sont composés également de VWF^{1,17,21,22}, une glycoprotéine multimérique essentielle à l'adhésion et l'agrégation plaquettaire.

Ils peuvent être associés à des dépôts hyalins au niveau du sous-endothélium. Par ailleurs, les lésions de nécrose fibrinoïde et les infiltrats inflammatoires vasculaires ou péri-vasculaires sont absents ou minimes^{1, 17}. Contrairement au SHU, les microthrombi glomérulaires sont habituellement très localisés, et on n'observe pas d'atteinte glomérulaire massive, ou de nécrose corticale¹⁷, ce qui est en accord avec les lésions rénales en général modérées.

C. Physiopathologie

1. Historique

Le Dr Eli Moschowitz, quand il décrit le PTT en 1924, évoque comme possible cause de cette pathologie «un puissant poison possédant des propriétés hémolytiques et agrégantes»¹³. Pourtant, la physiopathologie du PTT reste inconnue jusqu'en 1982, lorsque Moake *et al.*²³ retrouve d'inhabituels multimères de très haut poids moléculaire du VWF dans le plasma de quatre patients, qui présentaient un PTT chronique récurrent. Ces multimères de haut poids moléculaire sont plus grands que ceux retrouvés dans les plasmas normaux (Figure 3). Les auteurs concluent alors qu'il existe une anomalie du métabolisme des multimères de très haut poids moléculaires du VWF après synthèse et sécrétion endothéliale, qui provoquerait des rechutes chez ces patients.

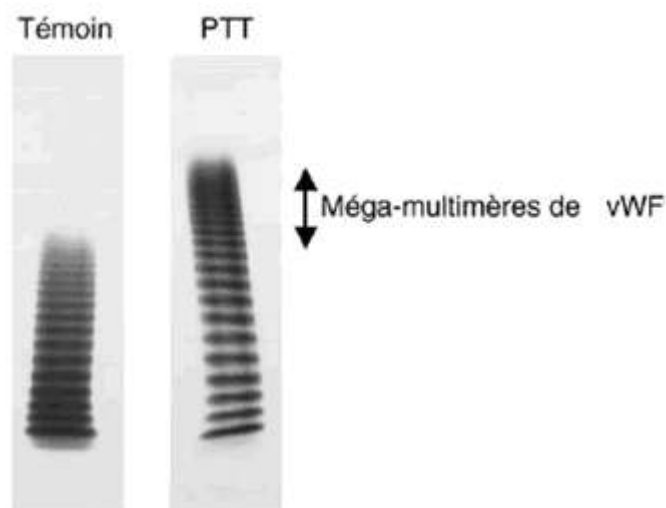


Figure 3 : Analyse par technique de western blot des multimères de VWF chez un patient atteint de PTT et un individu témoin (d'après Coppo *et al.* 2005²⁴)

En 1996, Tsai ²⁵ à New-York et Furlan ²⁶ en Suisse découvrent indépendamment qu'une métalloprotéase clive le VWF entre la tyrosine en position 1605 et la méthionine en position 1606. L'équipe de Furlan constate un an plus tard que l'activité de cette protéase est diminuée ou nulle chez 4 patients atteints de PTT chronique ²⁷.

Puis, Furlan *et al* étudie 30 patients atteints de PTT et concluent que le PTT sporadique est dû à un anticorps inhibiteur de la protéase clivant le VWF, alors que le PTT familial est dû à un déficit constitutionnel de la protéase ²⁸. Cette protéase est enfin identifiée en 2001 par Levy *et al.* par le biais d'une étude de liaison au sein de 4 familles de patients atteints de PTT congénital ²⁹. Cette étude de liaison sélectionne un gène candidat situé en 9q34 codant une protéase de la famille ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeats*), nommée ADAMTS13.

2. Le facteur de von Willebrand (VWF)

Le VWF est une glycoprotéine plasmatique multimérique jouant un rôle clé dans l'hémostase primaire : attaché au sous-endothélium, il permet l'adhésion plaquettaire en se liant à la glycoprotéine Ib (GPIb) du complexe GPIb-IX-V des plaquettes. A taux de cisaillement élevé du flux sanguin, il est également le médiateur privilégié de l'agrégation plaquettaire par le biais de son interaction avec le complexe GPIIb-IIIa des plaquettes. Il possède également une fonction importante dans la coagulation en assurant le transport et la protection du facteur VIII. Il est codé par un gène d'environ 176 kb situé sur le chromosome 12 en région 12p13.3, possédant 52 exons (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Le précurseur du VWF possède un peptide signal de 22 acides aminés, un propeptide de 741 acides aminés et le polypeptide de 2050 acides aminés ³⁰. Il est composé de plusieurs domaines ou motifs répétés et communs à d'autres protéines ³¹, qui se succèdent selon ce schéma : D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK (Figure 4). Le site de liaison à la glycoprotéine Ib, intervenant dans l'adhésion plaquettaire, est situé dans le domaine A1. Celui correspondant à l'intégrine α IIb β 3 (GPIIb-IIIa) plaquettaire, impliqué dans l'agrégation plaquettaire, est situé dans le domaine C1. Le domaine de liaison au facteur VIII se situe au niveau de D' et D3. La métalloprotéase ADAMTS13 clive le VWF au niveau du domaine A2, entre les résidus tyrosine en position 1605 et méthionine en 1606 du pré-pro-VWF.

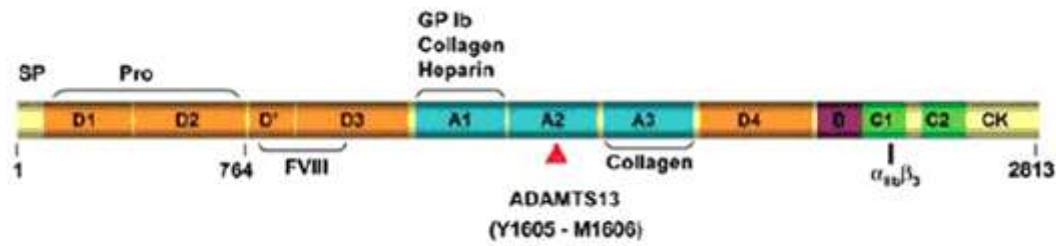


Figure 4 : Pré-pro-VWF et domaines de fixation de plusieurs protéines d'après Tsai *et al.* 2010 ¹⁷

Le VWF est synthétisé par les mégacaryocytes, où il est stocké dans des granules α , ensuite réparties dans les plaquettes ³², et par les cellules endothéliales, ces dernières sécrétant plus de 90 % du VWF plasmatique ¹⁷. Elles peuvent sécréter le VWF de manière non soumise à la régulation, mais aussi le stocker dans les corps de Weibel-Palade pour le libérer lors d'une stimulation. Le VWF subit une maturation nécessitant plusieurs étapes. Ainsi, dans le réticulum endoplasmique, deux monomères de pro-VWF se dimérisent via la formation d'un pont disulfure au niveau de leur extrémité carboxy-terminale ³¹. Ensuite, au niveau de l'appareil de Golgi, les dimères de VWF se polymérisent par la création de ponts disulfures au niveau de leur extrémité N-terminale, formant des polymères de haut poids moléculaire. Le propeptide est clivé avant la sécrétion du VWF ¹⁷. Ainsi, la polymérisation de monomères de VWF de 280 kDa génère des multimères dont la masse moléculaire varie de 1000 kDa à plus de 20 000 kDa ³¹, ces derniers étant alors appelés « mégamultimères » (Figure 5) ²⁴.

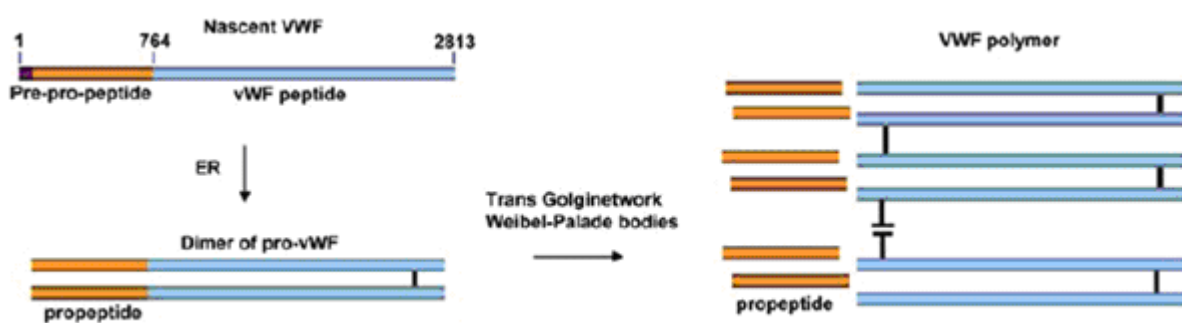


Figure 5 : Formation des multimères de VWF d'après Tsai *et al.* 2010 ¹⁷

3. Les mégamultimères de VWF et le rôle d'ADAMTS13

Des forces de cisaillement très élevées peuvent, à elles seules, induire la liaison de la GPIb plaquettaire au VWF, et par la suite favoriser l'agrégation plaquettaire^{33, 34}. Il a été montré que les mégamultimères du VWF ont, quant à eux, la capacité de se lier spontanément, en l'absence de forces de cisaillements, aux GPIb plaquettaires^{35, 36} et qu'ils génèrent l'adhésion plaquettaire de façon beaucoup plus efficace en présence de forces de cisaillement. L'utilisation d'une technique laser *tweezer* a mis en évidence l'existence de liaisons plus solides entre le complexe GPIb-IX-V et les mégamultimères de VWF comparées à celles créées avec les multimères plasmatiques³⁶. Cette affinité augmentée des mégamultimères pour la GPIb plaquettaire a été attribuée à un nombre de sites de fixation A1 plus important par molécule³¹. Cependant, certains auteurs suggèrent une différence de conformation des mégamultimères qui exposeraient le domaine A1³⁵. Par conséquent, les mégamultimères de VWF sont très thrombogènes et leur présence dans la circulation est régulée, notamment par le biais de la métalloprotéase ADAMTS13.

Les cellules endothéliales semblent sécréter, de façon continue, des multimères de VWF de plus petite taille, alors que les corps de Weibel-Palade renfermeraient une plus grande proportion de mégamultimères^{31, 35}. Le contenu de ces corps de Weibel-Palade est déversé par la cellule endothéliale lors d'une stimulation, notamment par l'histamine, la *Shiga-like* toxine, le TNF α , IL8 et IL6 complexé avec son récepteur³⁷. Les mégamultimères sécrétés formeraient des « chapelets » qui peuvent atteindre plusieurs millimètres de long, au niveau de la surface endothéliale³¹. Ces « chapelets » auraient des points d'ancrage à l'endothélium *via* des molécules de P-sélectine, sécrétées parallèlement aux mégamultimères et provenant aussi des corps de Weibel-Palade³⁸. Il a été montré que ces longs chapelets sont rapidement clivés par la métalloprotéase ADAMTS13 (de l'ordre de quelques secondes à 2 minutes *in vitro*³¹) (Figures 6 et 7).

Ainsi, un déficit de l'activité de la métalloprotéase ADAMTS13 provoquerait une accumulation des mégamultimères de VWF au niveau de la surface endothéliale de la microcirculation, conduisant à l'adhésion plaquettaire et à la formation de thrombi, et donc expliquerait le phénotype observé dans le PTT (Figure 7).

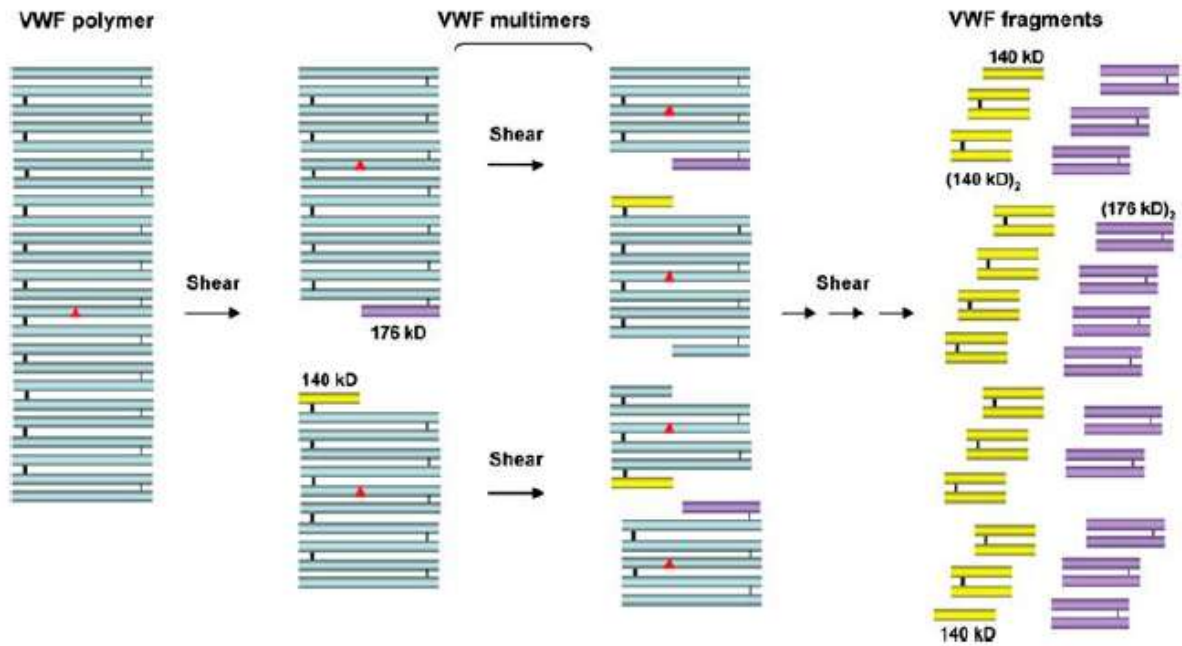


Figure 6 : Clivage des multimères de VWF ; les plus petits produits retrouvés sont des homodimères des fragments de 140 et 176 kD (d'après Tsai *et al.* 2010 ¹⁷)

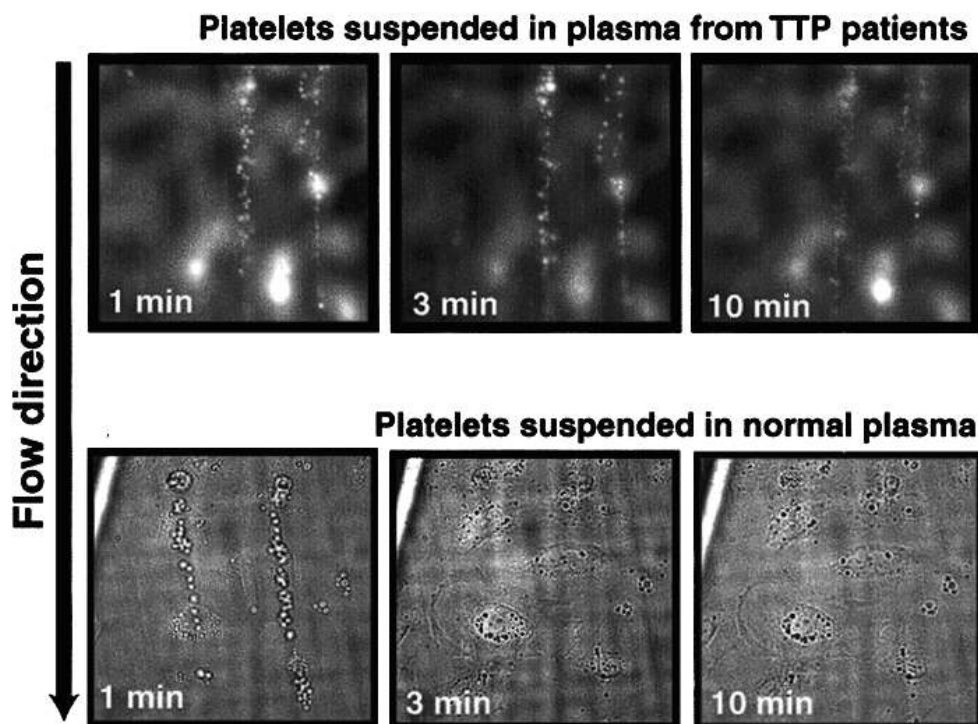


Figure 7 : Le plasma de patients atteints de PTT ne clive pas les chapelets de mégamultimères de VWF avec des plaquettes adhérentes (d'après Dong *et al.* 2002 ³²)

En haut, les mégamultimères avec des plaquettes adhérentes sont encore présentes après 10 minutes de perfusion à 2,5 dyne/cm² de plasma de patients avec PTT.

4. ADAMTS13

a) Les familles ADAM et ADAMTS

Les protéines de la famille ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*) ont des caractéristiques structurales proches des métalloprotéases des venins de serpents ³⁹. Ce sont des protéines transmembranaires qui possèdent un peptide signal, un propeptide, suivi d'un domaine métalloprotéase, un domaine désintégrine, un domaine riche en cystéine, un domaine EGF-like (*epidermal growth factor*), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique.

Les membres de la familles ADAMTS (*a disintegrin and metalloprotéinase with thrombospondin type 1 repeats*) possèdent une structure similaire avec le peptide signal, propeptide, les domaines métalloprotéases, désintégrine-like et riche en cystéine. Ils se distinguent cependant par la perte des répétitions EGF-like et du domaine transmembranaire, ce qui en fait des protéines sécrétées et non plus membranaires, et par la présence de domaines thrombospondine1-like (TSP1) et de plusieurs domaines variables à l'extrémité C-terminale (Figure 8).

Les protéases ADAMTS sont au nombre de 20 à ce jour ⁴⁰ ; ADAMTS4, 5, 8, 1, 15, 9 et 20 sont des protéoglycanases, ADAMTS2, 3 et 4 sont des aminopeptidases du procollagène. ADAMTS2 est impliquée dans le syndrome d'Ehlers-Danlos type VII C, et ADAMTS10 dans le syndrome de Weill-Marchesani autosomique récessif, qui sont des pathologies du tissu conjonctif . Certaines protéases ont une fonction encore inconnue.

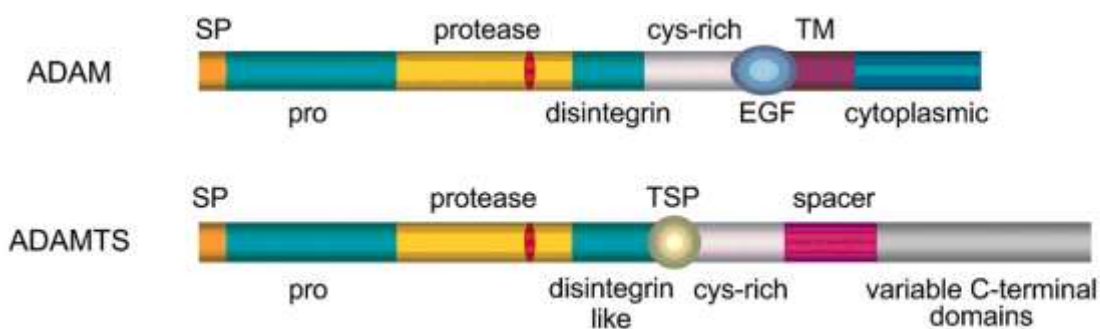


Figure 8 : Schéma représentant la structure des protéases des familles ADAM et ADAMTS d'après Levy *et al.* 2005 ³⁹

b) Le gène

Le gène codant la métalloprotéase ADAMTS13 est situé sur le chromosome 9 dans la région 9q34. Ce gène d'environ 37 kb (37 387 bases) contient 29 exons (Figure 9). L'extrémité 5'UTR (*untranslated region*) comporte 444 nucléotides, et l'extrémité 3'UTR est composée de 206 nucléotides.

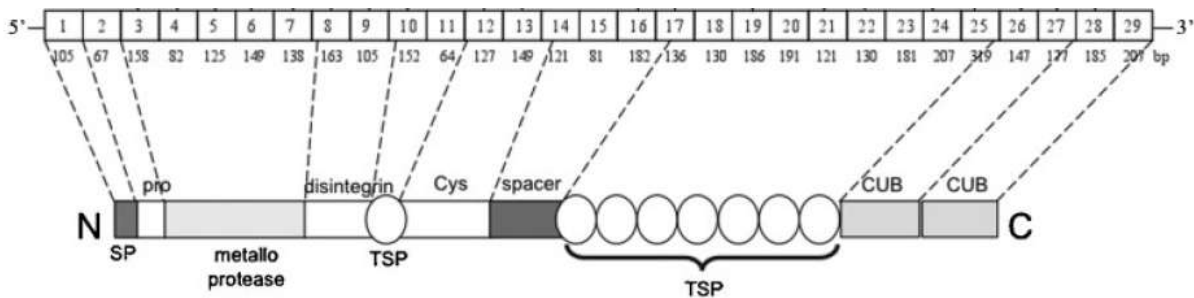


Figure 9: Schéma de la protéase ADAMTS13 (d'après Lotta *et al.* 2010⁴¹)

Sur le site de référence NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 3 isoformes sont décrits : le premier (NM_139025.3) est le plus long et considéré comme la référence. L'ARNm correspondant, de 4,9 kb environ, est traduit en une protéine de 1427 acides aminés. Les deux autres isoformes, NM_139026.3 et NM_139027.3, codent des protéines de 1340 et 1371 acides aminés respectivement.

L'étude de l'expression par northern blot décrite dans l'article de Levy *et al.*²⁹ retrouve un ARNm d'environ 4,7 kb dans le foie et un ARNm tronqué de 2,3 kb au niveau du placenta.

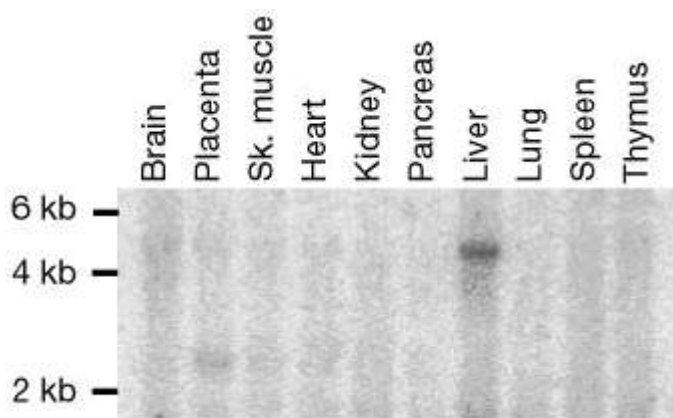


Figure 10 : northern blot d'ARN provenant de plusieurs tissus humains (d'après Levy *et al.* 2001²⁹)

D'après le site Genecards (www.genecards.org), le gène serait en fait exprimé dans de nombreux tissus : le thymus, la moelle osseuse, la rate, le cerveau, la moelle épinière, le cœur, les muscles squelettiques, les muscles lisses, le rein, le poumon, le foie, le pancréas, la prostate, le peau, les glandes salivaires, les ovaires, le placenta, les testicules.

c) Protéine ADAMTS13

ADAMTS13 est produite principalement par les cellules stellaires hépatiques ¹⁷, mais pourrait être également exprimée dans les cellules endothéliales et les plaquettes. C'est peut-être pour cette raison que l'on retrouve de l'ARNm d'ADAMTS13 de façon quasi-ubiquitaire sur les profils d'expression du site *Genecards*. La concentration plasmatique de la protéase est d'environ 1 µg/mL, et sa demi-vie entre 2 et 4 jours.

(1) Structure

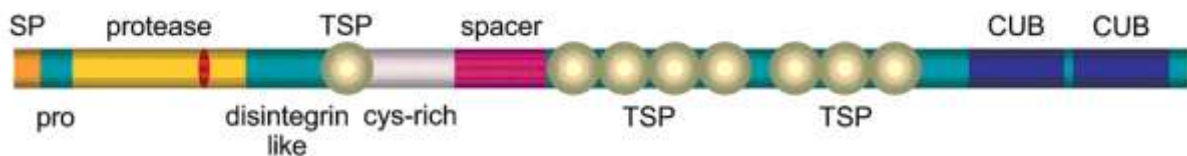


Figure 11 : Structure d'ADAMTS13 (d'après Levy *et al.* 2005 ³⁹)

SP : peptide signal

Pro : propeptide

TSP : *thrombospondin repeats*

CUB: acronyme formé avec les initiales de 3 protéines possédant ces domaines : complément (C1r/C1s), *sea urchin EGF*, *bone morphogenetic protein*

Le peptide signal est suivi d'un propeptide de 41 acides aminés, puis de la séquence de la protéine mature (Figure 11). Le propeptide possède un site de clivage par la furine. Contrairement aux autres métalloprotéases, le propeptide d'ADAMTS13 est court, et ne posséderait pas de motif « cystéine-switch » qui permet aux autres métalloprotéases d'inhiber l'activité protéasique jusqu'au clivage du propeptide ³⁹. Le domaine métalloprotéase contient un domaine catalytique qui agit en liaison avec l'ion Zn^{2+} , soit une séquence HEIGHSFGLEHD, les acides aminés soulignés étant conservés dans la famille ADAMTS.

Des acides aminés interfèrent avec l'ion Ca^{2+} ⁴². ADAMTS13 possède aussi un domaine désintégrine-like, un domaine TSP-1 central, puis un domaine riche en cystéine, et un domaine *spacer*. La métalloprotéase possède également 7 autres domaines TSP1 consécutifs, puis 2 domaines CUB (acronyme formé avec les initiales de 3 protéines possédant ces domaines : complément (C1r/C1s), *sea urchin EGF*, *bone morphogenetic protein*).

La protéine ADAMTS13 mature possède 1353 acides aminés, ce qui devrait correspondre à un poids moléculaire de 145 kD. Or, le poids moléculaire d'ADAMTS13 est en réalité de 190 kD, ceci étant dû à la glycosylation de la protéine. En effet, les domaines TSP1 sont O-glycosylés et il existe 10 acides aminés N-glycosylés le long de la protéine. Ces glycosylations sont essentielles pour le repliement et la sécrétion d'ADAMTS13.

(2) Fonction : le clivage des multimères de VWF

La fonction d'ADAMTS13 est le clivage des multimères de VWF entre leurs résidus Y1605 et M1606. Cependant, ce clivage est régulé ; il est notamment conditionné par la présence de forces de cisaillement intra-vasculaires. En effet, dans la circulation, la forme globulaire du VWF est résistante au clivage par ADAMTS13, le domaine de clivage étant cryptique au sein la structure globulaire.

Le rôle des forces de cisaillement est important : elles permettent d'une part, l'adhésion du VWF aux plaquettes et d'autre part, le clivage du VWF par ADAMTS13 par le biais d'un changement de la conformation du VWF. Elles induisent un changement conformationnel des multimères de VWF qui se déploient et exposent ainsi leur domaine A1, provoquant alors l'adhésion plaquettaire par liaison à la GPIb plaquettaire. Par ailleurs, les forces de cisaillement génèrent également un dépliement du domaine A2 de VWF, commençant par la partie C-terminale de A2, qui pourrait permettre la liaison de la protéase ADAMTS13 (des domaines métalloprotéase à *spacer*) et ensuite le clivage entre les résidus Y1605 et M1606. Il semblerait toutefois que le clivage par ADAMTS13 précède le recrutement plaquettaire ³⁹. D'autres auteurs ont montré que la liaison de GPIb au domaine A1 du VWF stimulait *in vitro* le clivage du domaine A2 par ADAMTS13 ⁴³.

Les domaines métalloprotéase, désintégrine-*like*, TSP1-1, riche en cystéine et *spacer* sont tous requis pour une reconnaissance et un clivage d'ADAMTS13⁴⁴. Le domaine *spacer* est indispensable à la reconnaissance du substrat (Figure12)⁴⁵.

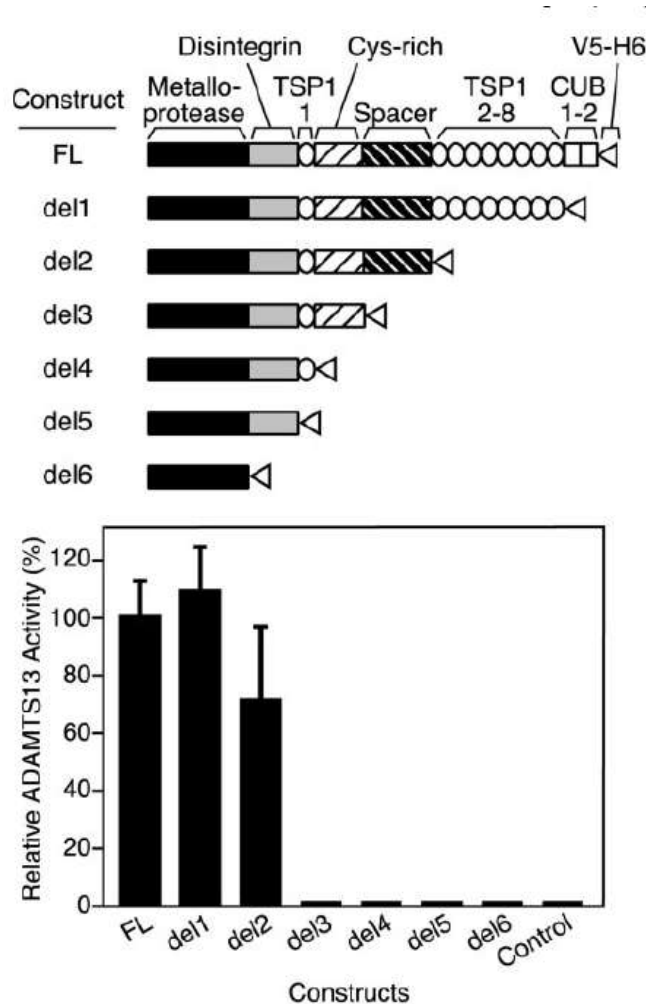


Figure 12 : Activité ADAMTS13 de la protéase complète et des variants tronqués d'après Zheng *et al.* 2003⁴⁵
 NB: *control* correspond au vecteur seul

Quant à la partie C-terminale d'ADAMTS13, il semblerait que les domaines TSP1 et CUB participent à la reconnaissance du VWF dans la circulation⁴⁶. La séquence du 5^{ème} TSP au 2^{ème} domaine CUB pourrait se lier avec un épitope dans la région D4-CK du VWF⁴⁷, avec une affinité modérée qui ne requiert pas de forces de cisaillement (Figures 13, 14). Puis, quand des forces de cisaillement apparaissent, cette situation d'ADAMTS13 favoriserait la liaison du domaine *spacer*⁴⁷ puis des domaines adjacents et enfin du clivage par le domaine métalloprotéase. Ce modèle n'exclut pas une liaison directe de la partie métalloprotéase, désintégrine, TSP1-1, riche en cystéine et *spacer* au domaine A2 du VWF.

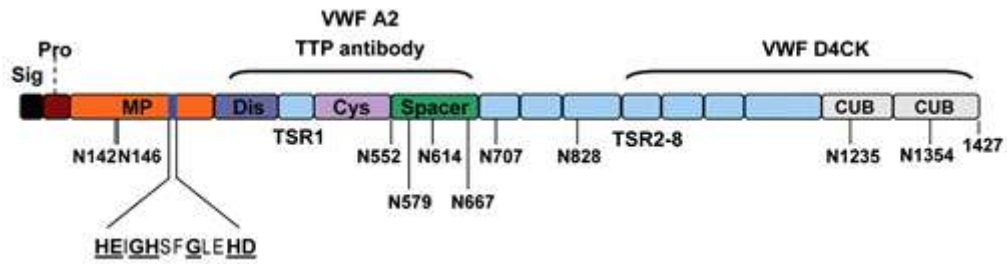


Figure 13 : Schéma structural D'ADAMTS13 (d'après Tsai *et al.* 2010¹⁷)

Il montre le site catalytique du domaine métalloprotéase, les sites de liaison au VWF, et les acides aminés N-glycosylés

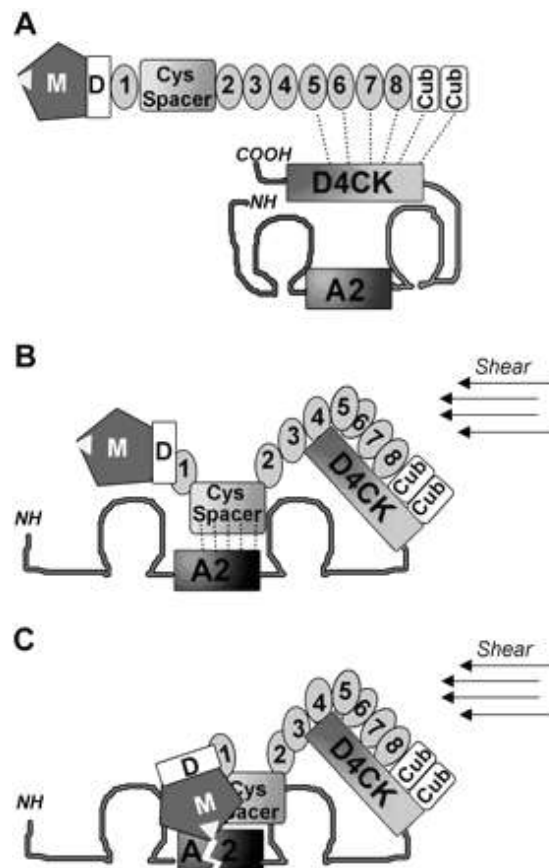


Figure 14 : Modèle de liaison d'ADAMTS13 aux multimères de VWF en 2 étapes (d'après Zanardelli *et al.* 2009⁴⁷)

A : en l'absence de forces de cisaillement, les multimères de VWF ont une structure repliée, le site de clivage est inaccessible. Toutefois, un site de liaison au niveau des domaines D4CK est exposé de façon continue, il se lie aux domaines TSP5-8 et CUB de la protéine ADAMTS13.

B : quand des forces de cisaillement apparaissent, l'ancrage préalable d'ADAMTS13 sur le VWF favoriserait l'exposition du domaine A2 et le positionnement correct du domaine *spacer*.

C : Clivage du VWF par la métalloprotéase

Les domaines TSP1 pourraient aussi se lier aux glycoprotéines transmembranaires CD36 au niveau des cellules endothéliales et des plaquettes, comme cela a été montré *in vitro* avec les plaquettes sans que cela inhibe l'activité enzymatique de la protéase⁴⁸.

D. Diagnostic

1. Mesure de l'activité ADAMTS13

En 1998, Furlan *et al.*²⁸ constatent que le PTT est associé à une baisse très importante de l'activité de la protéase du VWF durant la phase aiguë, inférieure à 5% de l'activité normale. Dans cette étude, la majorité des patients atteints de SHU sporadique ou familial possède une activité de la protéase du VWF normale.

Au moment de l'épisode aigu de PTT, le diagnostic est essentiellement clinico-biologique et impose un traitement urgent, sans connaître l'activité ADAMTS13, dont le dosage nécessite parfois plusieurs jours⁴⁹. La mesure de l'activité de la protéase permet de confirmer le diagnostic de PTT. L'effondrement de l'activité d'ADAMTS13 semble spécifique des formes acquises auto-immunes et congénitales de PTT^{22, 51}. Les MAT survenant dans un contexte de cancer, d'allogreffe de moelle osseuse, d'infection par le VIH, de grossesse, sont associées à une activité ADAMTS13 variable⁵². L'activité ADAMTS13 semble être partiellement réduite dans plusieurs conditions physiologiques ou pathologiques telles que le sepsis, la coagulation intravasculaire disséminée, les pathologies hépatiques, pendant la grossesse et chez les nouveaux nés, ou après une chirurgie^{50, 53, 54}. Au cours du PTT héréditaire ou syndrome d'Upshaw-Schulman, l'activité ADAMTS13 est indétectable quel que soit le moment du prélèvement, qu'il soit réalisé pendant l'épisode aigu ou en rémission. Les parents, porteurs d'une mutation hétérozygote, ont habituellement une activité ADAMTS13 diminuée, autour de la moitié de la valeur du témoin normal. En revanche, dans le PTT acquis auto-immun, l'activité ADAMTS13, effondrée en phase aiguë, peut être normale, ou rester diminuée en période de rémission.

Il existe plusieurs méthodes de dosage de l'activité ADAMTS13⁴⁹. Elles sont basées sur la dégradation de multimères de VWF plasmatiques purifiés ou recombinants, ou de peptides de synthèse par la protéase ADAMTS13 plasmatique du patient, et la mesure des produits de clivage ou du substrat restant. Plusieurs techniques sont utilisées pour effectuer cette mesure : l'électrophorèse sur gel, les techniques d'agrégation plaquettaire, les techniques immunologiques ou FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*). La plupart des méthodes développées jusqu'à maintenant se réalisent dans des conditions statiques qui ne reflètent pas les conditions physiologiques *in vivo*, de la circulation. Les méthodes utilisant des multimères de VWF requièrent l'adjonction de facteurs dénaturants (guanidine HCL, urée) pour permettre le clivage par la protéase, ces derniers pouvant affecter l'activité enzymatique de la protéase ou l'interaction avec les auto-anticorps neutralisants. Elles sont également longues et nécessitent parfois plusieurs jours. L'utilisation de peptides de synthèse comme substrat permet de réduire la durée des techniques.

2. Etiologique :

a) Auto-immune

La majorité des cas de PTT est d'origine acquise auto-immune, avec un premier épisode survenant à l'âge adulte, en moyenne dans la quatrième décennie^{8, 15, 55}. Les femmes sont préférentiellement touchées avec un sex ratio homme- femme de 1/2⁸ à 1/4^{16, 52}. Les individus d'origine africaine semblent davantage exposés^{8, 55, 16}. Cette prévalence accrue chez les femmes et les patients d'origine africaine peut être mise en relation avec un risque plus important de développer une pathologie auto-immune chez ces patients. En effet, le PTT peut survenir dans un contexte de pathologie auto-immune connue, comme le lupus érythémateux disséminé, le syndrome de Gougerot-Sjögren, la polyarthrite rhumatoïde, la cytopénie autoimmune, et autres. Des auto-anticorps de type anticorps antinucléaires, anticorps anti-DNA natif, anti-phospholipides, peuvent être mis en évidence⁸. Le PTT peut apparaître dans un contexte potentiellement inducteur d'autoimmunité comme la prise de médicament (notamment la Ticlopidine), la grossesse, l'infection par le VIH. Les patients de race noire ont physiologiquement un taux plasmatique de VWF plus élevé^{55, 56}, ce qui pourrait favoriser le déclenchement d'un PTT. Le PTT acquis évolue par poussées, qui peuvent rester uniques ou

se succéder, entrecoupées de rémissions ; on parle alors de PTT chronique récurrent ^{15, 20, 52}. La seconde poussée se produit généralement au cours de l'année suivante ¹⁶.

Dans les PTT acquis, l'effondrement de l'activité ADAMTS13 est imputé à la présence d'autoanticorps spécifiques, retrouvés dans la majorité des cas ⁸. Les techniques associent la recherche d'activité inhibitrice plasmatique et la recherche des anticorps par technique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Il s'agit majoritairement d'IgG bien que, rarement, des IgM et des IgA aient été décrits ¹⁷. Ils sont le plus souvent dirigés contre le domaine riche en cystéine et le domaine *spacer* de la protéase ²⁴. Les autoanticorps anti-ADAMTS13 sont le plus souvent inhibiteurs. Cependant, dans environ un tiers des cas, les anticorps sont non inhibiteurs et sont uniquement détectés par technique ELISA ⁵⁷. Ils pourraient néanmoins altérer l'activité ADAMTS13 par l'opsonisation de cette dernière et la diminution de sa demi-vie.

b) Altération constitutionnelle de la protéase : syndrome d'Upshaw-Schulman ou PTT congénital

En 1960, Schulman *et al.* publient le cas d'une enfant de 8 ans, présentant des épisodes récurrents d'anémie et thrombopénie avec purpura pétéchial ⁵⁸, répondant aux transfusions sanguines et plasmatiques. Les auteurs suggèrent ainsi chez cette patiente, le déficit d'un facteur plasmatique essentiel, stimulant la production plaquettaire. Upshaw ⁵⁹ rapporte en 1978 le cas d'une femme de 29 ans, qui présentait également des épisodes de fièvre, anémie, thrombopénie, purpura pétéchial, à raison de 6 à 10 épisodes par an pendant les douze premières années de sa vie, avec un début à l'âge de 6 mois. Il évoque comme étiologie le déficit d'un facteur plasmatique favorisant la survie érythrocytaire et plaquettaire. En 1978, Rennard décrit un nouveau cas de PTT congénital et propose d'associer ces deux noms au syndrome, créant ainsi le « syndrome d'Upshaw-Schulman ».

(1) Présentation clinico-biologique

Ce syndrome extrêmement rare ne représente pas plus de 5 % des cas de PTT, c'est-à-dire moins de 1 cas par million d'habitants par an. La transmission s'effectue sur le mode autosomique récessif. Par conséquent, le syndrome d'Upshaw-Schulman atteint les hommes comme les femmes ; les parents, qui peuvent être consanguins, sont sains.

La première poussée survient majoritairement dans l'enfance, en période néonatale précoce, ou plus tard, entre 2 mois et 4 ans le plus souvent⁶⁰. La forme néonatale se manifeste par un ictère sévère, une hyperbilirubinémie, une anémie hémolytique sévère avec schizocytose et test de Coombs négatif, et une thrombopénie souvent inférieure à 20 G/L. Fièvre et insuffisance rénale peuvent être associées. Les débuts plus tardifs pendant l'enfance sont souvent déclenchés par une infection. Néanmoins, certains patients ne présentent un premier épisode de PTT qu'à l'âge adulte ; certains d'entre eux après un épisode infectieux, ou, pour les femmes, lors d'une grossesse ou l'instauration d'une contraception oestroprogestative. L'âge de début peut différer entre les sujets atteints d'une même famille.

Parmi les signes cliniques, figurent, comme pour le PTT acquis, les troubles neurologiques (déficits focaux, crises convulsives, coma). Ils sont rares chez le nouveau-né. Près de la moitié des patients ayant subi des accidents vasculaires ont des séquelles neurologiques, telles un retard mental, des troubles du comportement, des crises convulsives, une surdité. Une insuffisance rénale aiguë, secondaire à une hémoglobinurie, peut survenir durant un épisode aigu, avec rétablissement au décours. Cependant, des lésions permanentes rénales sont retrouvées chez des patients n'ayant pas reçu de plasmathérapie préventive.

Le PTT héréditaire est caractérisé par des rechutes, qui peuvent survenir toutes les 2-3 semaines, ou après un délai de plusieurs mois, voire années. Certains patients présentent une thrombopénie et une hémolyse chronique, qui peuvent se compliquer de lithiase biliaire. Les rechutes, ou récurrences, peuvent être déclenchées par des situations durant lesquelles la production de VWF augmente, comme un acte chirurgical, une infection, ou le troisième trimestre de la grossesse.

(2) Variants décrits

Depuis 2001, 78 mutations ont été décrites, dont 48 faux-sens (soit 62%), 10 non-sens (13%), 8 délétions (10%), 4 insertions (5%) et 8 mutations d'épissage (10%)^{41, 61 à 83}. Des cas de PTT congénital ont été décrits sur tous les continents. La majorité des patients atteints de PTT héréditaire sont hétérozygotes composites (environ 2/3), les autres ont une mutation à l'état homozygote. Sur les 48 variants faux-sens, 34 (soit 70%) sont localisés dans la moitié comprenant l'extrémité 5' du gène, correspondant aux domaines métalloprotéase à *spacer*. La figure 15 collige les variants décrits depuis 2001.

Plusieurs polymorphismes, c'est-à-dire des variants de séquence dont la fréquence est supérieure à 1% dans une population témoin, sont retrouvés dans le gène ADAMTS13. Certains polymorphismes sont silencieux, ils ne provoquent pas de changement d'acide aminé. Ceux-ci ne sont pas représentés dans la figure 15. En revanche, certains polymorphismes génèrent un changement d'acide aminé, et sont qualifiés dans de nombreux articles de « polymorphismes non-synonymes », même si des études *in vitro* ont montré que certains d'entre eux étaient associés à une diminution de sécrétion et/ou d'activité de la protéase. Ces polymorphismes faux-sens sont donc représentés dans la figure 15.

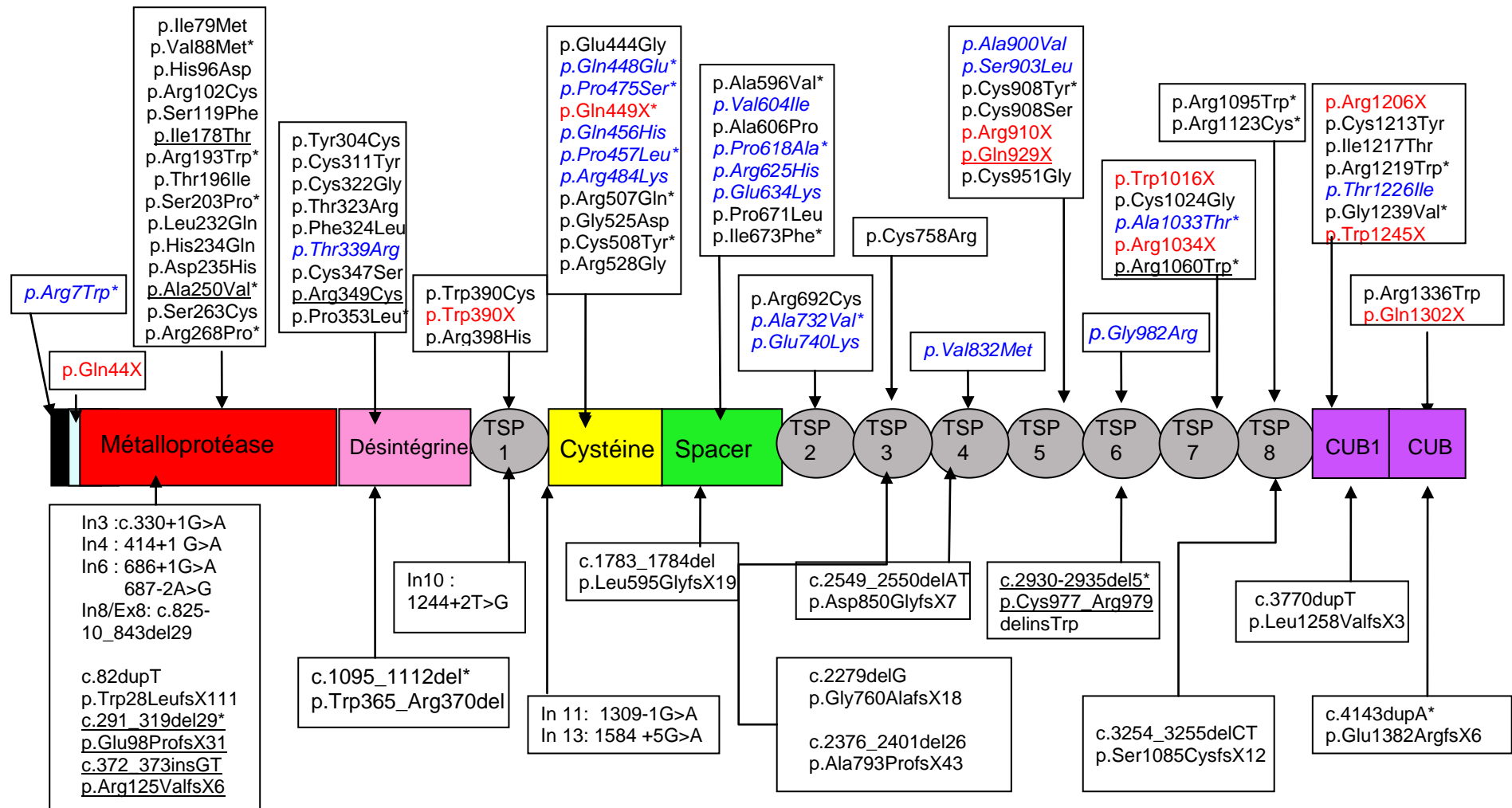


Figure 15: Mutations et polymorphismes non-synonymes décrits dans la littérature internationale^{41, 61 à 83}

Variants exprimées dans des recombinants*

PTT révélé à l'âge adulte

Mutations non-sens , polymorphismes non synonymes

Environ un quart des mutations a été exprimé dans des cultures cellulaires et les mécanismes par lesquels elles induisent une baisse de l'activité de la protéase ADAMTS13 ont été étudiés. Il s'agit d'une baisse de la sécrétion de la protéine ou d'une réduction de son activité catalytique ⁴¹. Le mécanisme NMD (Non-sens mRNA decay) a été également impliqué ⁶³. Ce processus de destruction de l'ARN messager est déclenché par deux signaux : un codon STOP prématuré et l'existence d'une marque de jonction exon-exon en 3' de celui-ci.

E. Traitement

1. PTT acquis d'origine auto-immune

Le traitement des épisodes aigus est urgent, et repose sur les échanges plasmatiques (EP) ⁴. Ces derniers permettent l'élimination des autoanticorps inhibiteurs, des multimères de VWF de très haut poids moléculaire, et surtout l'apport de protéase ADAMTS13. Ils sont en général quotidiens jusqu'à normalisation de la numération plaquettaire, et sa stabilisation pendant au moins 48 heures, puis la décroissance du rythme est progressive ²⁴. Les EP ont un effet temporaire, alors qu'un traitement immunosuppresseur, plus étiologique, pourrait induire une rémission prolongée. Ainsi, l'instauration d'une corticothérapie à la phase aiguë est systématique dans la plupart des équipes. Les PTT réfractaires au traitement par EP, ou récurrents, ont été traités par le passé par la vincristine, le cyclophosphamide, la cyclosporine, ou par splénectomie. Cependant, l'utilisation récente du Rituximax, un anticorps monoclonal anti-CD20, s'est révélée extrêmement efficace et bien tolérée. Le Rituximab pourrait devenir un traitement de première ligne des PTT réfractaires et récidivants ⁸⁴.

Les transfusions de plaquettes, pouvant majorer les événements thrombotiques, sont contre-indiquées. Des antiagrégants plaquettaires (aspirine, dipyridamole) sont discutés lorsque la numération plaquettaire excède 50 G/L.

2. Syndrome d'Upshaw-Schulman

Le traitement de la phase aiguë du PTT héréditaire est la plasmathérapie, qui apporte la protéase ADAMTS13 en quantité suffisante pour faire s'amender les symptômes⁶⁰. Chez les nouveau-nés, l'échange transfusionnel est le plus souvent pratiqué en raison de l'hyperbilirubinémie sévère.

Une plasmathérapie préventive peut être instituée toutes les 2, 3, voire 4 semaines. Les épisodes d'infection, de vaccination, requièrent une surveillance biologique accrue, voire une intensification de la plasmathérapie. Une chirurgie nécessite également l'administration de plasma frais congelé. Enfin, la grossesse implique aussi l'intensification du traitement, mais il n'a pas encore été fixé de terme pour la débiter.

II. But du travail : projet de séquençage du gène ADAMTS13 chez des patients suspects de PTT héréditaire

En France, un Centre National de Référence des Microangiopathies Thrombotiques de l'adulte et de l'enfant (CNR-MAT) constitué de cliniciens et de biologistes, a été labellisé en 2006 grâce au Plan National Maladies Rares. Le coordonnateur est le Pr Paul Coppo (Département d'hématologie clinique, Hôpital Saint-Antoine, Paris), et le Pr Agnès Veyradier (service d'hématologie biologique, Hôpital Antoine Bécélère, Clamart) est responsable du laboratoire référent ADAMTS13 du CNR-MAT. Depuis 2002, l'équipe INSERM dont est responsable le Pr Agnès Veyradier au sein de l'U770 Inserm (Kremlin Bicêtre) était la seule équipe française à réaliser le séquençage du gène ADAMTS13 dans le cadre d'un projet hospitalier de recherche clinique (PHRC). Progressivement, la littérature internationale a renforcé l'imputabilité des mutations du gène ADAMTS13 dans le syndrome d'Upshaw-Schulman. Il apparaissait donc logique de faire progresser le séquençage du gène ADAMTS13 d'un statut de recherche clinique à un statut d'exploration génétique à des fins médicales diagnostiques. C'est pourquoi le service de Génétique Moléculaire du CHU de Nantes (Pr Bézieau) a été associé à ce travail depuis 2010.

Le but de mon travail de thèse, au sein du service de Génétique Moléculaire du Pr Bézieau, a donc été de réaliser une mise au point et le séquençage du gène ADAMTS13 en vue d'étudier la cohorte nationale de patients suspects de syndrome d'Upshaw-Schulman. Les analyses biochimiques préalables, telles la mesure de l'activité ADAMTS13, de l'antigène de la protéase, la recherche d'une activité inhibitrice circulante et d'anticorps IgG anti-ADAMTS13 ont été réalisées à l'hôpital Antoine Bécélère de Clamart et à l'Unité Inserm U770, du Kremlin Bicêtre.

Cette étude génétique a permis non seulement de confirmer le diagnostic de syndrome d'Upshaw-Schulman suspecté sur des arguments phénotypiques clinico-biologiques mais aussi de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie orpheline en tentant d'élucider les relations génotypique/phénotype.

III. Matériel et méthodes

A. Recrutement des patients

Les patients ont été sélectionnés à partir de 3 bases de données sur une période de 10 ans. Il s'agit de la base de donnée du Centre National de Référence des Microangiopathies thrombotiques (CNR-MAT), celle du laboratoire référent ADAMTS13 du CNR-MAT (service d'hématologie biologique, Hôpital Antoine Bécère, Clamart), et celle du PHRC national AOM 0512 ADAMTS13 « Facteurs pronostiques dépendants d'ADAMTS13 dans le PTT de l'adulte et de l'enfant ». Les critères utilisés pour définir les PTT sont les suivants: anémie hémolytique mécanique et thrombopénie, éventuellement associées à des signes d'ischémie viscérale, et activité ADAMTS13 inférieure à 10%. Les patient(e)s, ou leurs parents en ce qui concerne les mineurs, ont signé un consentement éclairé conformément à la loi de Bioéthique de 2004, sous le contrôle du CPP (Comité de Protection des Personnes) de l'hôpital Saint-Antoine et du CPP de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière. La majorité d'entre eux a également signé un consentement relatif à l'étude génétique effectuée secondairement.

B. Tests biochimiques effectués à l'hôpital Antoine Bécère de Clamart et à l'Unité Inserm U770, Le Kremlin Bicêtre

Les prélèvements sanguins périphériques sont réalisés dans des tubes citratés (citrate de sodium 0,109 M). Après une double centrifugation (deux fois 15 minutes, à 2500g), le plasma pauvre en plaquettes a été décanté et congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

1. Mesure de l'activité ADAMTS13

La mesure de l'activité ADAMTS13 a été réalisée par deux techniques. En ce qui concerne les patients atteints de PTT dès l'enfance, elle repose sur la mesure par IRMA (*Immunoradiometric assay*), de l'antigène résiduel de VWF après incubation du plasma avec du VWF recombinant de type sauvage (« full-length »). Le plasma est traité avec de l'urée pour permettre l'exposition du site de clivage, en dehors des conditions physiologiques de la

circulation. Plusieurs dilutions sont incubées pendant 48 heures avec le substrat. L'activité ADAMTS13 du plasma testé est inversement proportionnelle au VWF résiduel. Un pool de plasmas normaux, dont l'activité est fixée arbitrairement à 100%, est utilisé pour la calibration.

Une autre technique a été employée pour mesurer l'activité de la protéase chez les patients atteints de PTT révélé à l'âge adulte. Elle est fondée sur la mesure de la vitesse d'hydrolyse d'un substrat synthétique, le FRET-S-VWF73, un peptide de synthèse de 73 acides aminés issu du VWF et contenant le site de clivage par ADAMTS13. Ce peptide est flanqué d'un fluorochrome et d'un absorbeur d'énergie. Après excitation à 340 nm, l'énergie émise par le fluorochrome est, soit transmise à l'absorbeur si le peptide est intact, soit libérée sous forme d'un photon (à 450 nm), si le peptide a été hydrolysé. La pente de la courbe représentant la fluorescence au cours du temps est proportionnelle à l'activité d'ADAMTS13. L'activité ADAMTS13 est considérée comme normale entre 50 et 150 %.

2. Antigène ADAMTS13

La mesure de l'antigène d'ADAMTS13 plasmatique a été réalisée par technique ELISA, avec un kit commercialisé IMUBIND ADAMTS13 ELISA (*American Diagnostica Inc, Stamford, CT, USA*). La normale est située entre 438 et 752 ng/mL dans la technique utilisée.

3. Recherche d'une activité inhibitrice circulante

Un inhibiteur circulant anti-ADAMTS13 a été recherché par la mesure de l'activité résiduelle de la protéase dans un mélange de plasma à tester et de plasma témoin, constitué d'un pool de sujets normaux. Après une incubation d'une heure à 56°C destinée à dissocier les complexes immuns, les plasmas à tester sont mélangés à un pool de plasmas normaux (ratio 2/1) et incubés 30 minutes à température ambiante. L'activité ADAMTS13 est ensuite mesurée par l'une des techniques décrites ci-dessus. L'activité inhibitrice circulante a été considérée comme positive s'il existait une activité résiduelle d'ADAMTS13 inférieure à 30%.

4. Recherche et titrage d'IgG anti-ADAMTS13

La recherche et le titrage des IgG anti-ADAMTS13 ont été réalisés par technique ELISA, à l'aide du kit commercialisé TECHNOZYM® ADAMTS13 INH (*Technoclone*, Vienne, Autriche). La recherche est considérée comme négative si le taux d'IgG est inférieur à 12UI/mL).

C. Séquençage du gène ADAMTS13

L'objectif de ma thèse est la mise au point et le séquençage des 29 exons, des jonctions intron-exon, de l'extrémité 3'UTR et d'une partie de l'extrémité 5'UTR du gène ADAMTS13 de patients suspects de PTT héréditaire.

1. Extraction de l'ADN

L'ADN des leucocytes a été extrait à l'aide du kit Nucléon BACC2 *GE Healthcare* à partir de sang total prélevé sur tube EDTA. Les étapes sont les suivantes : lyse cellulaire, déprotéinisation de l'ADN, extraction au chloroforme, reprise de la phase aqueuse et précipitation de l'ADN par l'éthanol absolu. L'ADN a été solubilisé et conservé dans une solution de TE (Tris-EDTA).

2. PCR (Polymérase Chain réaction)

La PCR est une réaction qui vise à l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN défini. Elle nécessite 3 étapes, chacune requérant une température particulière : la dénaturation de l'ADN, puis l'hybridation de deux amorces nucléotidiques spécifiques des extrémités du fragment à amplifier, puis l'élongation c'est-à-dire la synthèse d'ADN complémentaire au brin matrice par une ADN polymérase ; l'ensemble constituant un cycle, répété 25 à 40 fois.

La réaction de PCR va nécessiter de l'ADN génomique, des amorces oligonucléotidiques, des désoxyribonucléotides tri-phosphates libres (dNTP), une ADN polymérase (Platinum® Taq DNA Polymerase, *invitrogen*), une solution tampon pour maintenir un pH stable et idéal pour la Taq polymérase, du MgCl₂ (les cations divalents Mg²⁺ sont des cofacteurs de la Taq polymérase, ils permettent aussi la neutralisation des charges négatives des groupements phosphates de l'ADN). Dans l'amplification des exons 12 et 19, nous avons ajouté de la bétaine (N,N,N-triméthylglycine) afin de stabiliser l'hybridation de régions riches en GC. Les exons 7 et 8, très riches en GC, ont nécessité l'utilisation d'un kit spécifique (*TaKaRa LATaq with GC buffer, TAKARA BIO INC, Japan*). La grande majorité des amorces possèdent une « extrémité M13 », c'est-à-dire une séquence nucléotidique commune universelle, qui permet de faciliter le séquençage. Les amorces et les conditions de PCR sont détaillées ci-après (Tableaux 2 à 6).

Exon	Amorces	
1	F	TGTA AACGACGGCCAGTCCCTGAACTGCAACCATCTT
	R	CAGGAAACAGCTATGACCTCAGTGAGCACACTTCATCC
2	F	TGTA AACGACGGCCAGTGGTCTCCCCAAGTGTTAGGA
	R	CAGGAAACAGCTATGACCTTAATTAACAGGGTTGACAGCA
3	F	TGTA AACGACGGCCAGTAAGCACACAATAGCCCAACA
	R	CAGGAAACAGCTATGACCAGAACCCCGAGCCATTCTAC
4	F	TGTA AACGACGGCCAGTCTCTCCAGCTCTTCACACTCC
	R	CAGGAAACAGCTATGACCTTCTGTGATCCATGCTGCTT
5	F	TGTA AACGACGGCCAGTGGAGGACTAACTGGGAAACAAA
	R	CAGGAAACAGCTATGACCCTGGGGTCACCTTTGCAG
6	F	TGTA AACGACGGCCAGTGTAGCCGAGCTTTCTGATGG
	R	CAGGAAACAGCTATGACCTACAAGGACCCACTGCTTGC
7	F	TGTA AACGACGGCCAGTACTGCGCCCAGTTAGCAG
	R	CAGGAAACAGCTATGACCAGTGGGGACGGACGTAGAG
8	F	TGTA AACGACGGCCAGTCGAGA ACTCCTGTTCCCACT
	R	CAGGAAACAGCTATGACCGGTTCTCACCATGCACGTTT
9	F	TGTA AACGACGGCCAGTTCTGGGAGGGACAGTTAAGG
	R	CAGGAAACAGCTATGACCTACTGGTCCTGCCTCCTGAC
10-11	F	TGTA AACGACGGCCAGTAGGATGTTGGGGGACTCTCT
	R	CAGGAAACAGCTATGACCCTGGTGTGAACCACAGATGG
12	F	TGTA AACGACGGCCAGTTGCCATGTAGTCTCCCAGTG
	R	CAGGAAACAGCTATGACCCTATGACTCTGCCCTGTCC
13	F	TGTA AACGACGGCCAGTCCCAGATGCAAAGGATGAAG
	R	CAGGAAACAGCTATGACCAGGCTGACTCCAAGTCCAGA
14	F	AGAGTCATTGAGGCCAGCA
	R	CTGGGCTGTGGCCATCTT
15	F	TGTA AACGACGGCCAGTTCCCGACCAGCTAAGATCAG
	R	CAGGAAACAGCTATGACCAGAAGTGAGGGCATCTTGG
16	F	TGTA AACGACGGCCAGTGATGCCTGTGGCTCCTTAGA
	R	CAGGAAACAGCTATGACCGGATGGATAGACAAACGAGCA
17-18	F	TGTA AACGACGGCCAGTGGGATGCAAGAAGAAGTTGG
	R	CAGGAAACAGCTATGACCCTCAAGCCTCAGTGTCTC
19	F	TGTA AACGACGGCCAGTGTAGTGCCCATGCTTGTCC
	R	CAGGAAACAGCTATGACCCTCAGGAGGAGGGGATTCTC
20	F	TGTA AACGACGGCCAGTCCCTAGCAGCTGGGCTATAC
	R	CAGGAAACAGCTATGACCAGCATTCCCACAGAAGGATG
21	F	TGTA AACGACGGCCAGTGCCACTTCCTGGTCTCTCTG
	R	CAGGAAACAGCTATGACCGAACGAGGCAAGATGCAAGT
22	F	GGGCCTTATGTGCTAGAGGT
	R	ATGGTCCAGCCTCACACAGT
23	F	TGTA AACGACGGCCAGTGGAAATGAAGGGGAGACCTG
	R	CAGGAAACAGCTATGACCTGCACTCCTGGACTCAAGTG
24	F	TGTA AACGACGGCCAGTAGTACACGTGGGTGGAGAGG
	R	CAGGAAACAGCTATGACCATGAGCCAATGCCTCCTAGA
25	F	TGTA AACGACGGCCAGTTTAACTGCCTCCCAGCTTGT
	R	CAGGAAACAGCTATGACCACAGGAAGGAGGACAGGACA
26	F	TGTA AACGACGGCCAGTCCCTACCTCCTGGTCTCCTT
	R	CAGGAAACAGCTATGACCTGGGATGCAA ACTACAGGTG
27	F	TGTA AACGACGGCCAGTGGGAGAGGTGGGACTTGAA
	R	CAGGAAACAGCTATGACCTCCCTCCGTATCTTCCCCT
28	F	CAGGAAACAGCTATGACCTCCCTCCGTATCTTCCCCT
	R	CAGGAAACAGCTATGACCACGCCCTAGGGAAAGCTG
29	F	TGTA AACGACGGCCAGTTGTGATCCGGAATCTGTGAG
	R	CAGGAAACAGCTATGACCCTATGGGATGGGTTTCA

Tableau 2: Amorces utilisées (F signifiant " sens" (*forward*) et R "anti-sens" (*reverse*)), la partie en rouge correspondant à l'extrémité M13

	Concentration finale	
	Tous les exons sauf 7, 8, 12, 19	Exons 12 et 19
Tampon 10X (<i>Platinum® Taq DNA polymerase</i>)	1	1
MgCl ₂ (mM)	1,5	1,5
dNTP (mM)	0,2 × 4	0,2 × 4
Primer F (μM)	0,5	0,5
Primer R (μM)	0,5	0,5
Bétaine (M)		0,5
Enzyme (<i>Platinum® Taq DNA polymerase</i>)	0,25 μL/tube	0,25 μL/tube
H ₂ O	qsp 50 μL/tube	qsp 50 μL/tube

Tableau 3: Concentrations finales des mix de PCR pour tous les exons, excepté les exons 7 et 8.

Kit <i>TaKaRa LATAq with GC buffer</i>	Concentration finale pour les exons 7 et 8
GC buffer I 2X	1,15
dNTP (mM)	0.12 × 4
Primer F (μM)	0,58
Primer R (μM)	0,58
Enzyme	0,5 μL/tube
H ₂ O	qsp 40,5 μL/tube

Tableau 4: Concentrations finales des mix de PCR des exons 7 et 8

Etape		Température	Temps pour tous les exons, exceptés le 7 et le 8	Temps pour les exons 7 et 8
Dénaturation initiale		94°C	5 minutes	1 minute
35 cycles	Dénaturation	94°C	30 secondes	30 secondes
	Hybridation	60°C	30 secondes	30 secondes
	Elongation	72°C	30 secondes	30 secondes
Elongation finale		72°C	7 minutes	5 minutes

Tableau 5: Programmes d'amplification des PCR

Les produits d'amplification ont ensuite été purifiés par une enzyme à activité exonucléase, qui élimine les amorces libres, et une enzyme à activité phosphatase, qui empêche l'incorporation des dNTP libres dans l'ADN ; les échantillons ont incubé 15 minutes à 37°C puis 15 minutes à 80°C.

3. Le séquençage

Le séquençage utilise la méthode de Sanger et est automatisé (séquenceur ABI *Applied Biosystems* 3130, USA)

Tout d'abord, une PCR est réalisée, avec une ADN polymérase, des amorces spécifiques en ce qui concerne les exons 14 et 22, et des amorces M13F et M13R pour les autres exons, des désoxyribonucléotides, et des didésoxyribonucléotides (ddNTP). Ces dernières vont empêcher, par l'absence de groupement hydroxyle en 3', la liaison phosphodiester d'un autre nucléotide et donc entraînent le blocage de la synthèse d'ADN. Ces ddNTP sont marqués par 4 fluorochromes différents selon leur base. Etant donné le nombre exponentiel de copies du fragment d'ADN, des ddNTP terminateurs sont incorporés dans les fragments d'ADN synthétisés à chaque nucléotide, d'où la synthèse de brins d'ADN de taille différentes. La réaction de séquence a été réalisée à l'aide du kit *ABI prism BigDye Terminator 1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems)*, contenant l'ADN polymérase, les désoxyribonucléotides, et les didésoxyribonucléotides terminateurs. Pour chaque puit, 1 µL de Bid Dye Terminator, 1 µL de tampon 5X, 1 µL d'amorce (à 1,6 pmol/µL), 5 µL d'eau et 2 µL de produits de PCR sont requis. La réaction de séquence est réalisée selon les étapes suivantes :

		Température	Durée
Dénaturation initiale		96°C	1 minute
25 cycles	Dénaturation	96°C	10 secondes
	Hybridation	50°C	5 secondes
	Elongation	60°C	1 minute 15 secondes

Tableau 6: Programme de la réaction de séquence

Les produits de la réaction de séquence ont été ensuite purifiés par filtration sur un complexe de microbilles (Gel Séphadex® G50) qui piègent les dNTP et les ddNTP fluorescents. Cette purification a été réalisée sur plaque *Millipore, Multiscreen-HV*, chargée de G50 solidifié après 2 centrifugations de 3 minutes à 2000 tours/minutes. Les produits de la réaction de séquence sont déposés en surface des puits, puis une nouvelle centrifugation de 2 minutes à 2000 tours/minutes est nécessaire pour récupérer les produits de la réaction de séquence purifiée, en plaque de 96 puits.

Enfin, le séquenceur capillaire va permettre la migration des fragments d'ADN néosynthétisés de tailles différentes, dont le dernier nucléotide émet une fluorescence propre à sa base, qui est détectée par un laser. La lecture de la fluorescence va permettre d'établir la séquence nucléotidique du fragment d'ADN. Le séquenceur ABI Applied Biosystems 3130 a été utilisé, et les paramètres d'injection sont les suivants : 1,2 Kvolt-10 secondes. Les données sont ensuite traitées sur le logiciel *SeqScape® Software v2.5* de la société *Applied Biosystems* et comparées à un modèle de référence. Le logiciel *Alamut 2.0®* est également utilisé pour l'analyse des séquences.

IV. Résultats

Nous avons réparti les patients en deux cohortes distinctes, une cohorte de patients ayant développé des « poussées » de PTT dès l'enfance, et une seconde cohorte de patient atteints de PTT à révélation tardive, à l'âge adulte. Vingt-quatre patients composent la cohorte des cas de PTT pédiatrique, tandis que la cohorte de cas de PTT révélés à l'âge adulte est composée de 11 patientes. Tous les patients considérés ont une activité ADAMTS13 inférieure à 10% au moment de l'épisode et en période de rémission, un dosage d'antigène ADAMTS13 inférieur à 65 ng/mL, une recherche d'activité inhibitrice circulante négative, et un taux d'IgG inférieur à 12 UI/mL. Les données biologiques sont donc toutes en faveur d'un PTT héréditaire.

A. PTT révélés dans l'enfance

1. Epidémiologie et clinique

La cohorte de patients qui ont développé un PTT pendant l'enfance est composée de vingt-quatre patients (P1 à P24), dont quatorze de sexe masculin et dix de sexe féminin. Dix patients sont d'origine caucasienne, quatre sont originaires d'Afrique, huit d'Asie, et deux d'Amérique. Plus de 90% des patients a eu un premier épisode de PTT en période néonatale. Sur les dix-huit patients dont on sait qu'ils ont fait un second épisode de PTT, quatorze l'ont fait moins d'un an ou jusqu'à un an après le premier épisode aigu. Sur le plan clinique, les patients ont une thrombopénie importante, avec une médiane à 25 G/L, et une anémie avec une médiane à 9 g/dl. La majorité des patients présente des signes rénaux, notamment une protéinurie, et six d'entre eux ont présenté une insuffisance rénale aiguë. Seulement six patients ont présenté des symptômes neurologiques, mais ceux-ci étaient majoritairement graves avec quatre accidents vasculaires cérébraux (AVC) et des épisodes de coma pour un patient. Le tableau 7 collige les données épidémiologiques et cliniques des patients de cette première cohorte.

Tableau 7 : Epidémiologie, signes cliniques et biologiques des patients atteints de PTT à révélation dans l'enfance

Patient	Année de naissance	Sexe	Origine ethnique	Age du premier épisode de PTT	Age du second épisode de PTT	Biologie		Clinique		
						Hb (g/dL)	plaquettes (G/L)	Symptômes rénaux	Symptômes neurologiques	Autres symptômes
P1	1968	M	Caucasien	Naissance	1 an	-	-	Protéinurie	Aucun	aucun
P2	1974	M	Caucasien	Naissance	5 ans	11	17	Protéinurie	Aucun	aucun
P3	1977	M	Caucasien	Naissance	-	7	43	Insuffisance rénale terminale	2 AVC ischémiques	Ischémie rétinienne
P4	1981	F	Caucasien	Naissance	6 mois	10	20	Aucun	Aucun	Aucun
P5	1983	F	Caucasien	Naissance	18 mois	10	11	Protéinurie	Aucun	Aucun
P6	1986	M	Caucasien	Naissance	5 ans	7	45	Protéinurie	Aucun	Aucun
P7	1992	F	Haïti	Naissance	6 mois	8	27	Protéinurie	Aucun	Aucun
P8	1993	M	Magreb	Naissance	6 mois	10	30	Protéinurie	Aucun	Aucun
P9	1995	F	Haïti	Naissance	1 an	10	25	Protéinurie	Coma à 3 et 6 mois	Ischémie digestive
P10	1995	M	Caucasien	Naissance	1 mois	9	45	Aucun	Aucun	Aucun
P11	1998	F	Mauritanie	Naissance	9 mois	9	26	Protéinurie	Aucun	Aucun
P12	2001	F	Sri-Lanka	Naissance	3 ans	10	35	Insuffisance rénale aiguë	Aucun	Aucun
P13	2005	M	Sri-Lanka	Naissance	9 mois	9	25	Insuffisance rénale aiguë	Aucun	Ischémie du faisceau His (BAV)
P14	2002	M	Turquie	Naissance	10 mois	9	6	Aucun	Aucun	Aucun
P15	2005	M	Caucasien	Naissance	1 an	7	13	Insuffisance rénale aiguë	Hémorragie cérébrale	Aucune
P16	2006	F	Caucasien	Naissance	11 mois	10	19	Insuffisance rénale aiguë	Hémorragie cérébrale	Aucune
P17	2006	M	Tunisie	20 jours	14 mois	8	11	Protéinurie, hématurie	Aucun	Aucun
P18	2007	F	Maroc	Naissance	8 mois	7	19	Protéinurie	Aucun	Aucun
P19	2009	M	Caucasien	Naissance	-	8	40	Aucun	Aucun	Aucun
P20	2009	F	Pakistan	Naissance	-	11	17	Aucun	Aucun	Aucun
P21	2007	F	Inde	2 ans	-	4,5	30	Aucun	AVC ischémique	Aucun
P22	2007	M	Inde	1 an	-	4,5	20	Aucun	Aucun	Aucun
P23	1988	M	Liban	Naissance	6 mois	8	30	Protéinurie	Parésie faciale	Aucun
P24	1984	M	Liban	-	-	10	45	Insuffisance rénale	Aucun	Aucun

2. Résultats du séquençage des exons et jonctions introns-exons du gène ADAMTS13

Les variants retrouvés au cours du séquençage des 29 exons, des jonctions introns-exons et d'une partie des extrémités 5' et 3' non traduites sont détaillés dans le tableau 8. La figure 16 synthétise la distribution des variants trouvés. Les 32 mutations retrouvées dans la cohorte se distribuent tout le long de la protéine, aussi bien au niveau de la moitié N-terminale contenant le domaine métalloprotéase que dans les domaines TSP1 et CUB. Il n'y a pas de « points chauds », c'est-à-dire d'endroit plus particulièrement siège de mutations. Nous avons trouvé neuf mutations d'épissage (soit 28% des mutations) dans cette cohorte de patients, dont six substitutions au niveau de sites accepteurs ou donneurs d'épissage, une substitution sept nucléotides avant le début de la séquence exonique, une substitution trois nucléotides après la fin de l'exon et une délétion de vingt-neuf nucléotides au niveau de la jonction intron 7 – exon 8. Trois duplications dont l'une (c.4143dupA (p.Glu1382ArgfsX6)) est retrouvée chez trois patients non apparentés, et une délétion de deux nucléotides, produisent un décalage du cadre de lecture (soit 12,5% de mutations provoquant un décalage du cadre de lecture) . Quatre mutations non-sens (soit 12,5 % des mutations) ont été retrouvées, dont une dans deux familles différentes (c.3616C>T (p.Arg1206X)). Quinze mutations sont des faux-sens (soit 47% des mutations), dont l'une est retrouvée chez deux patients non apparentés (c.1787C>T générant p.Ala596Val).

Comme deux patients ont chacun un frère ou une sœur atteints, nous considérerons que la fratrie compte pour un cas index, ce qui fait vingt-deux patients. Treize patients sur les vingt-deux (soit 59%), sont hétérozygotes composites, ce qui correspond aux données de la littérature. Huit patients (soit 36%), sont homozygotes pour une mutation. Pour les patients dont on a pu étudier les parents, la mutation a été retrouvée à l'état hétérozygote chez les deux parents, comme le montrent les arbres généalogiques de la figure 17. En ce qui concerne les patients pour lesquels l'étude génétique a pu être réalisée chez les parents, aucune mutation *de novo* n'a été retrouvée. L'un des patients (P14) ne présente qu'une seule mutation hétérozygote.

Tableau 8: Variants des exons et jonctions intron-exon du gène ADAMTS13 dans la cohorte de cas pédiatriques
(Htz signifie hétérozygote, hmz homozygote)

Patient	Mutations					Polymorphismes non-synonymes	
	Intron/ Exon	Variant	Statut	Protéine	Domaine	avec effet délétère prouvé	sans effet délétère majeur prouvé
P1	Intron 13 Exon 29	c.1584+2T>A c.4143dupA	Hétérozygote Hétérozygote	p. ? p.Glu1382ArgfsX6	Riche en cystéine CUB-2		
P2	Intron 3 Exon 29	c.330+3G>C c.4143dupA	Hétérozygote Hétérozygote	p. ? p.Glu1382ArgfsX6	Métalloprotéase CUB-2	c.1852C>G p.Pro618Ala htz	c.19C>T p.Arg7Trp htz c.1342C>G p.Gln448Glu hmz
P3	Intron 11 Exon 21	c.1309-1G>A c.2723G>C	Hétérozygote Hétérozygote	p. ? p.Cys908Ser	Riche en cystéine TSP1-5		c.19C>T p.Arg7Trp htz c.3097G>A p.Ala1033Thr htz
P4	Exon 13 Exon 16	c.1520G>A c.1787C>T	Hétérozygote Hétérozygote	p.Arg507Gln p.Ala596Val	Riche en cystéine <i>Spacer</i>		
P5	Intron 8 Exon 29	c.988-2A>G c.4085A>T	Hétérozygote Hétérozygote	p. ? p.Asp1362Val	Désintégrine CUB-2		
P6	Exon 8 Exon 19	c.825-10_843del29 c.2272T>C	Hétérozygote Hétérozygote	p. ? p.Cys758Arg	Métalloprotéase TSP1-3		c.1342C>G p.Gln448Glu htz
P7	Exon 7 Exon 14	c.803G>C c.1643G>T	Hétérozygote Hétérozygote	p.Arg268Pro p.Cys548Phe	Métalloprotéase Riche en cystéine		c.1342C>G p.Gln448Glu htz
P8	Exon 24	c.3070T>G	Homozygote	p.Cys1024Gly	TSP1-7		c.1874G>A p.Arg625His htz
P9	Exon 16	c.1787C>T	Homozygote	p.Ala596Val	<i>Spacer</i>		
P10	Exon 17	c.2074C>T	Homozygote	p.Arg692Cys	TSP1-2	c.1852C>G p.Pro618Ala hmz	c.1342C>G p.Gln448Glu hmz c.2195C>T p.Ala732Val hmz
P11	Exon 6 Exon 25	c.607T>C c.3254_3255delCT	Hétérozygote Hétérozygote	p.Ser203Pro p.Ser1085CysfsX12	Métalloprotéase TSP1-8		c.1342C>G p.Gln448Glu htz
P12/P13	Exon 26	c.3616C>T	Homozygote	p.Arg1206X	CUB-1		c.1342C>G p.Gln448Glu hmz
P14	Exon 26	c.3655C>T	Hétérozygote	p.Arg1219Trp	CUB-1		c.2699 C>T p.Ala900Val htz

Patient	Mutations					Polymorphismes non-synonymes	
	Intron/ Exon	Variant	Statut	Protéine	Domaine	avec effet déletère prouvé	sans effet déletère majeur prouvé
P15	Exon 19 Exon 29	c.2404C>T c.4143dupA	Hétérozygote Hétérozygote	p.Gln802X p.Glu1382ArgfsX6	TSP1-3 CUB-2		
P16	Intron 13 Exon 17	c.1585-1G>C c.2085C>G	Hétérozygote Hétérozygote	p. ? p.Cys695Trp	Riche en cystéine TSP1-2		c.1342C>G p.Gln448Glu htz
P17	Exon 18	c.2203G>T	Homozygote	p.Glu735X	TSP1-2		
P18	Exon 12	c.1312T>C	Homozygote	p.Cys438Arg	TSP1-1		c.1342C>G p.Gln448Glu htz
P19	Intron 6 Exon 26	c.687-7C>A c.3616C>T	Hétérozygote Hétérozygote	p. ? p.Arg1206X	Métalloprotéase CUB-1		
P20	Intron 17	c.2104+1G>A	Homozygote	p. ?	TSP1-2		
P21/P22	Exon 12 Exon 12 Exon 8	c.1328T>C c.1409G>A c.844G>C	Hétérozygote Hétérozygote Hétérozygote	p.Leu443Pro p.Trp470X p.Val282Leu	Riche en cystéine Riche en cystéine Métalloprotéase		
P23	Exon 1 Exon 16	c.22dupG c.1908dupG	Hétérozygote Hétérozygote	p.Ala8GlyfsX131 p.Leu637AlafsX18	Métalloprotéase Spacer		c.2699 C>T p.Ala900Val htz
P24	Intron 27	c.3892+1G>A	Homozygote	p. ?	CUB-1		

Suite du tableau 8

Figure 16: Variants retrouvés chez les patients atteints de PTT révélé pendant l'enfance

Variants exprimés dans des recombinants*, **mutations non-sens**, *polymorphismes non synonymes*

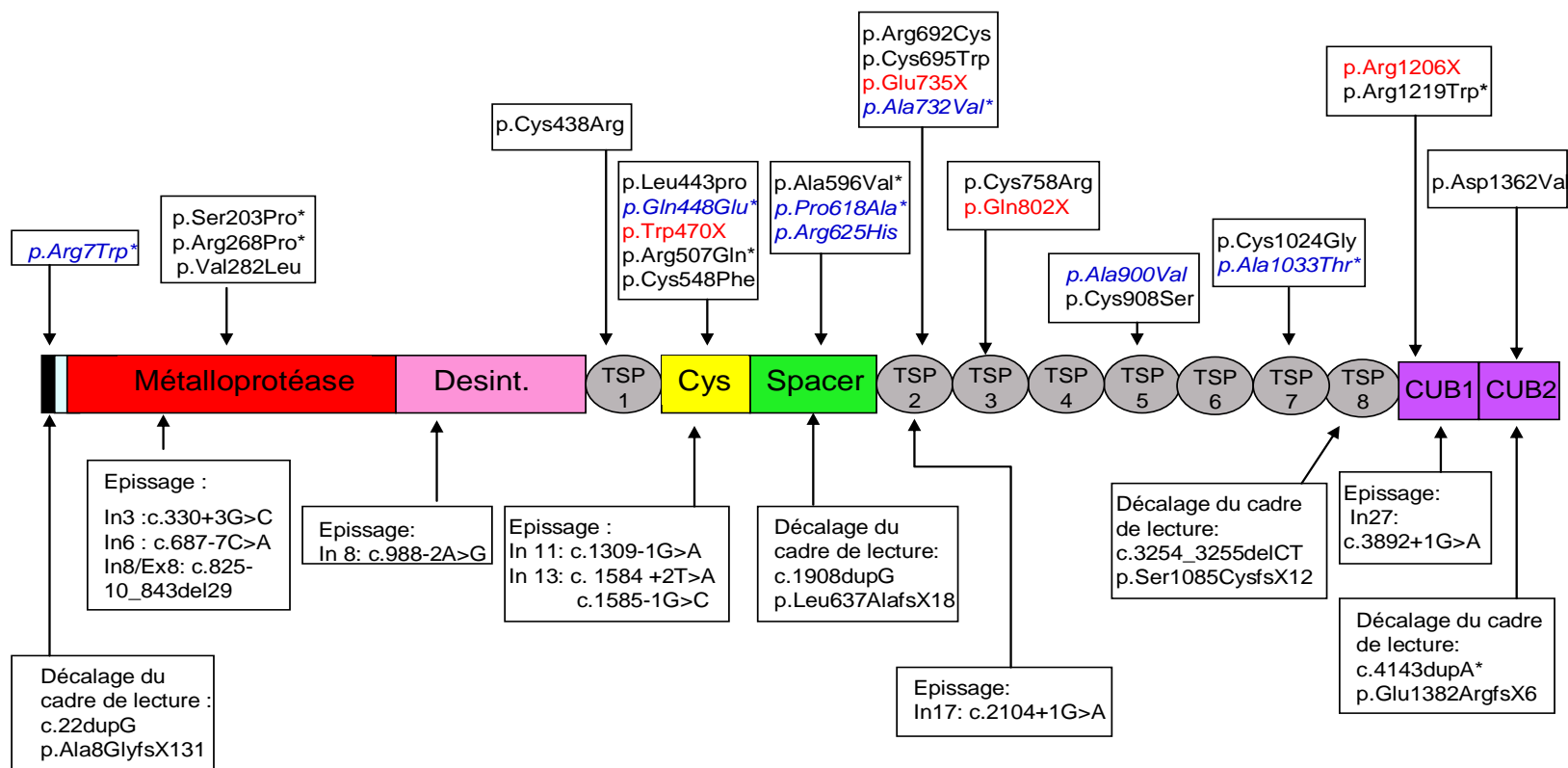
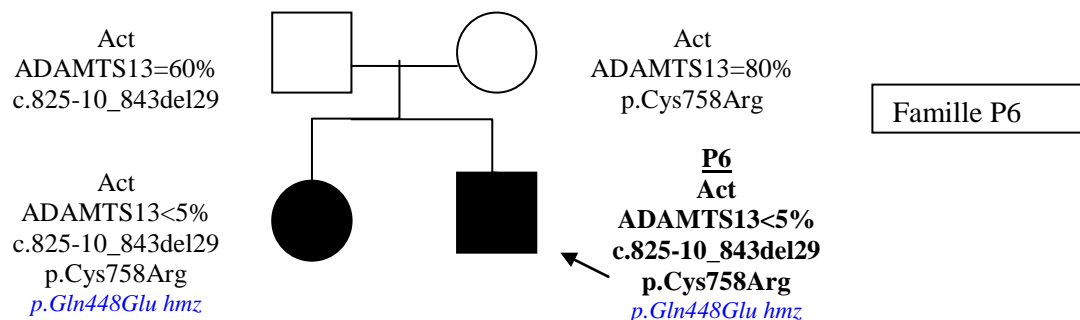
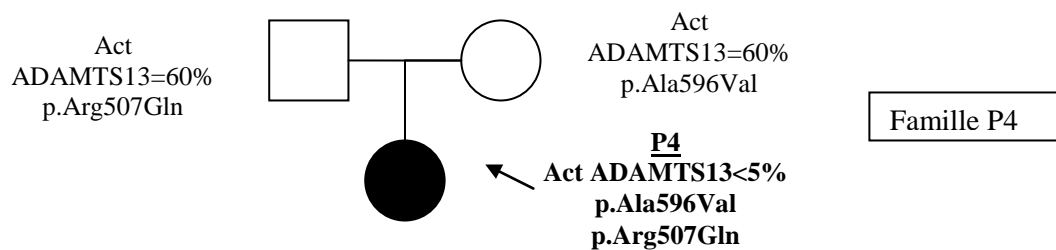
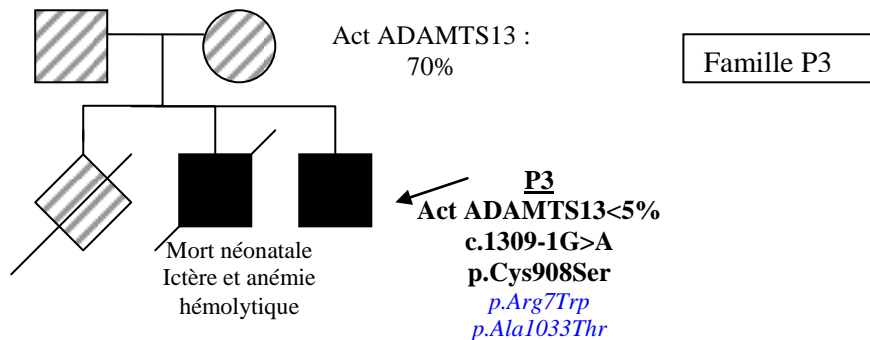
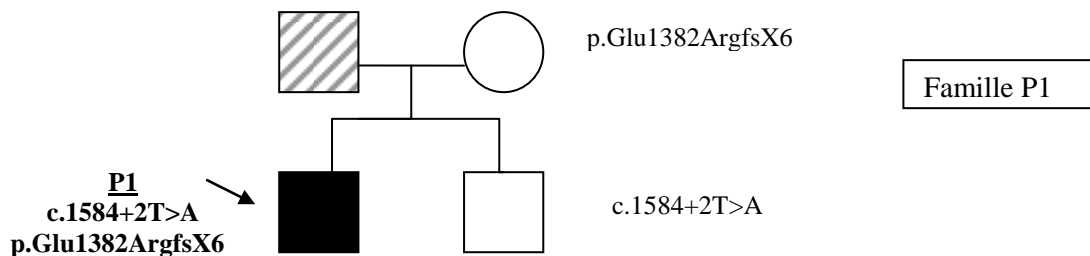


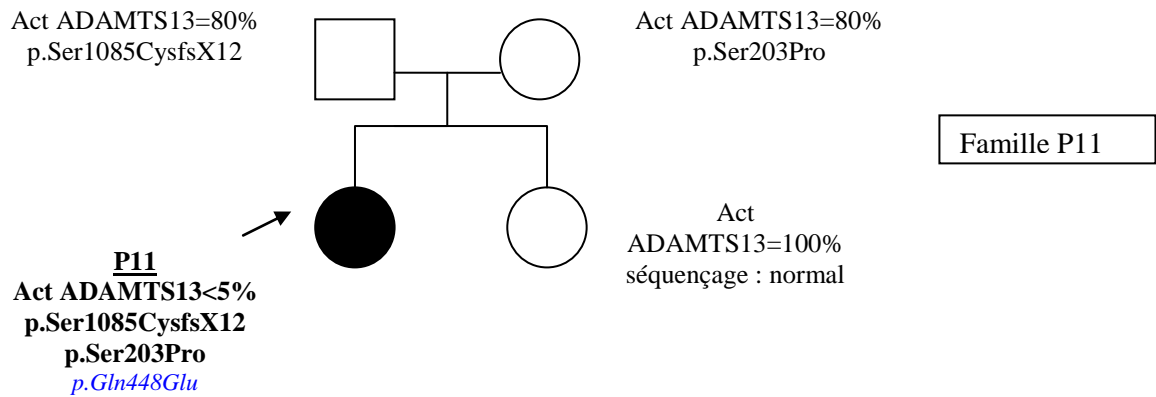
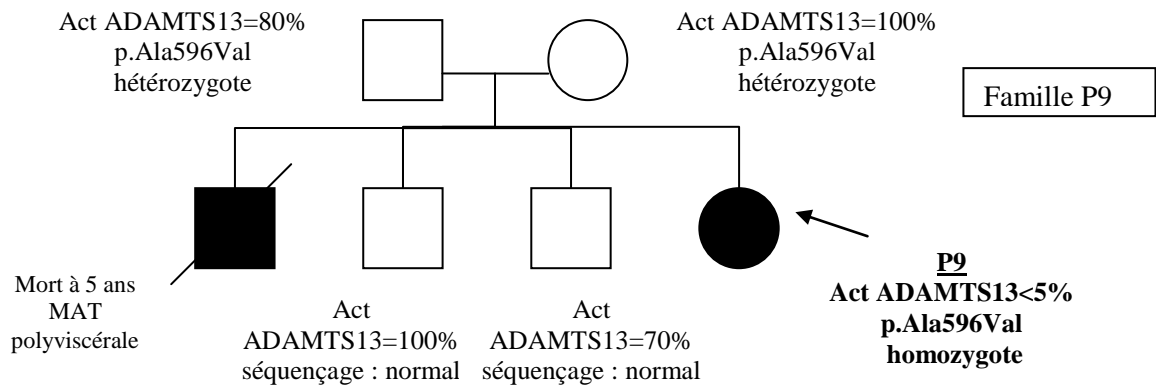
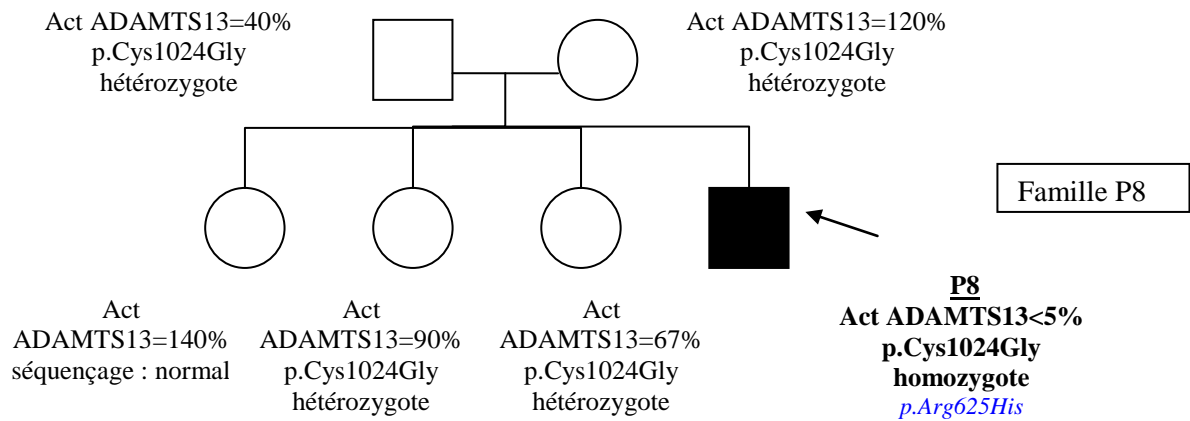
Figure 17: Arbres généalogiques des patients atteints de PTT durant l'enfance

(Ne sont présentés que les arbres généalogiques des familles dont nous disposons des informations)

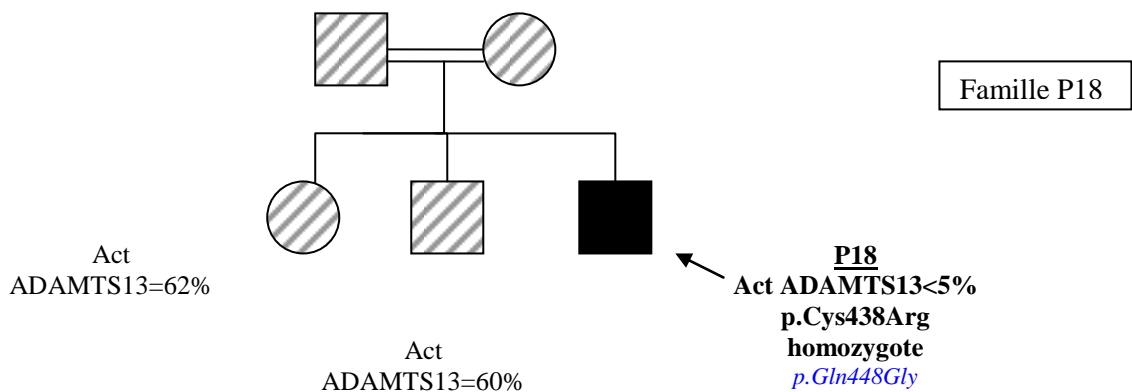
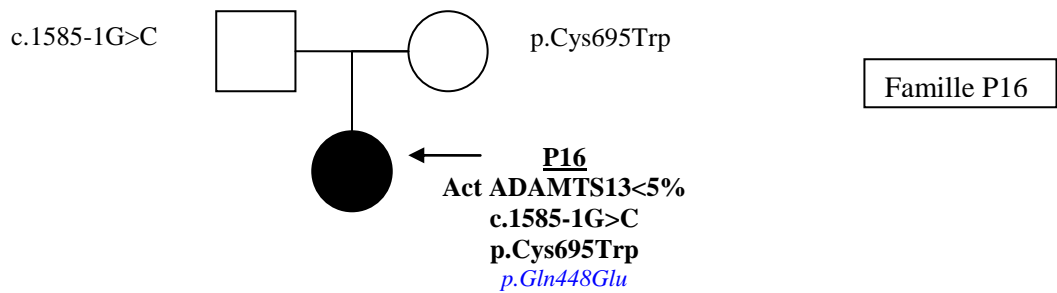
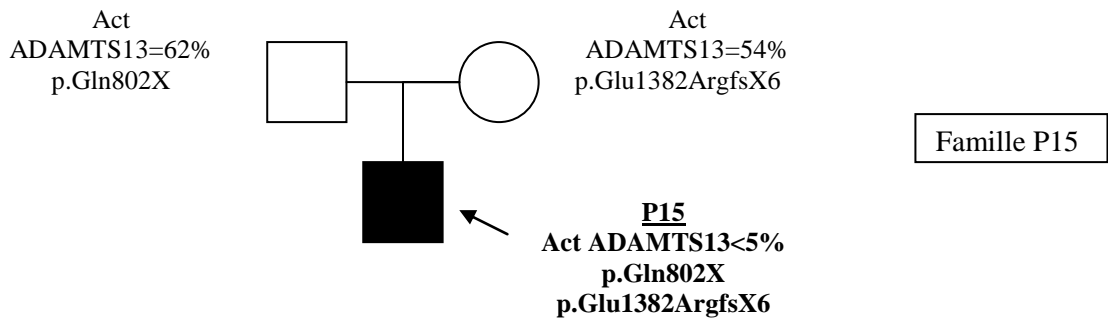
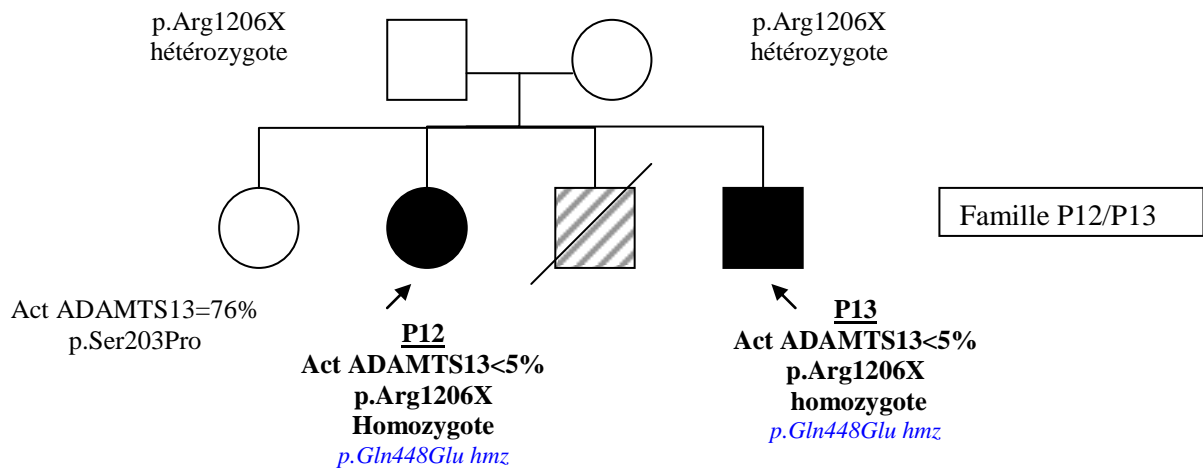
- Patients atteints de PTT
- ▒ Patients avec activité ADAMTS13 < 5% dont on ignore s'ils ont développé des symptômes
- ▨ Apparentés dont nous ne disposons pas de l'ADN



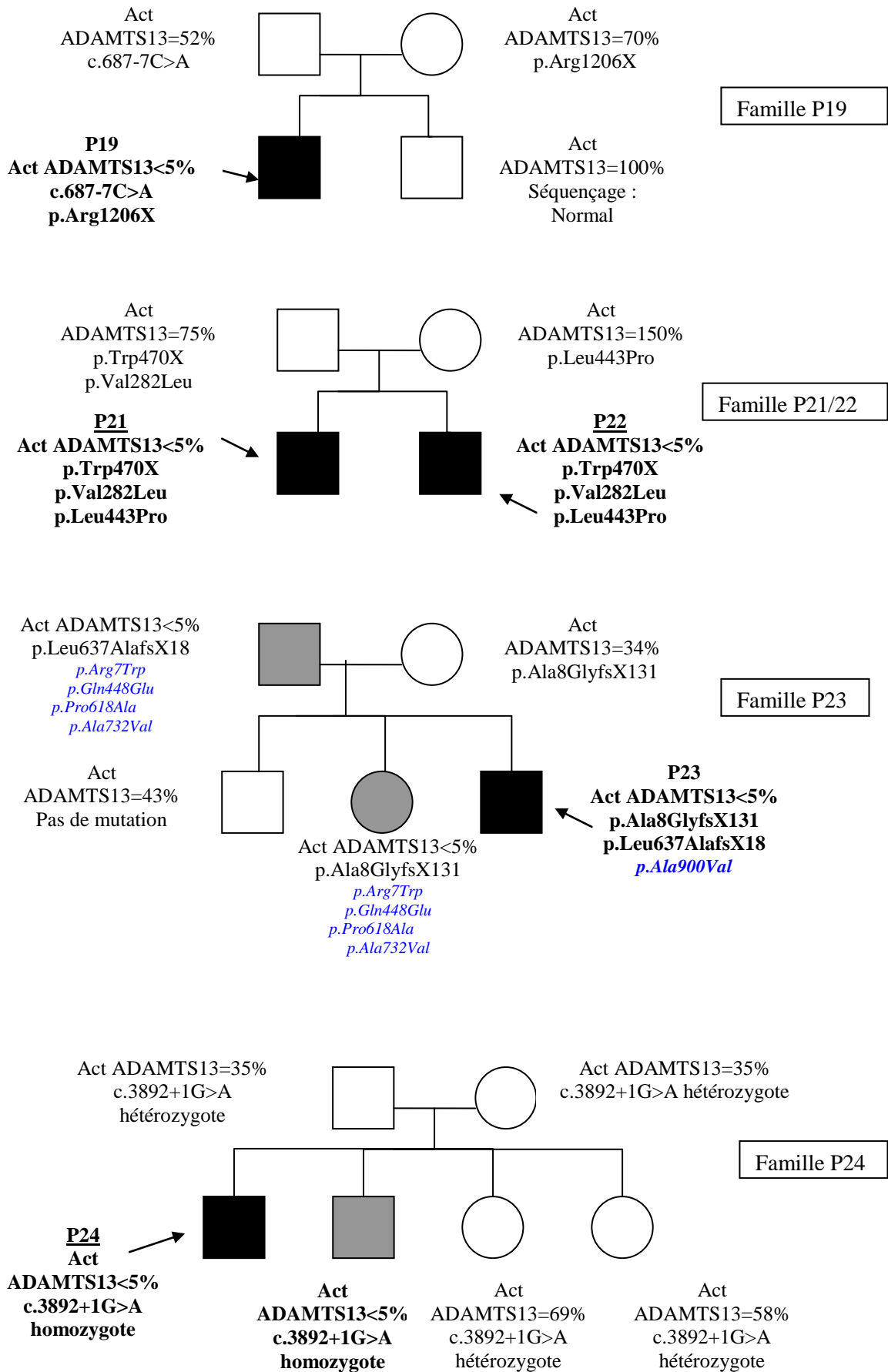
Suite figure 17



Suite figure 17



Suite figure 17



B. Cohorte de patients avec PTT révélé à l'âge adulte

1. Epidémiologie et clinique

La deuxième cohorte regroupe les 11 patients (A1 à A11) suspects de PTT héréditaire à révélation tardive, à l'âge adulte. Les caractéristiques épidémiologiques et cliniques de ces patients sont détaillées dans le tableau 9. Il faut souligner que ces patients sont exclusivement des femmes, et que le premier épisode de PTT est survenu à chaque fois à l'occasion d'une grossesse. La poussée de PTT a parfois été considérée tout d'abord comme une pré-éclampsie « atypique » et diagnostiquée comme PTT au décours de la première grossesse ou à l'occasion de la deuxième grossesse. La patiente A8 est la sœur du patient P6 qui fait partie de la première cohorte des cas pédiatriques. Deux sœurs, A2 et A3, ont présenté chacune un PTT à l'occasion de leur grossesse respective.

Tableau 9: Epidémiologie et clinique des patients avec PTT révélés à l'âge adulte (d'après Thèse d'exercice de Marie Moatti, 2010 ⁸⁵)

Patient	Année de naissance	Sexe	Origine ethnique	Age du 1er épisode de PTT	Circonstances du 1er épisode de PTT	Prise en charge de l'épisode aigu	Enfant	Prise en charge à distance	Autres épisodes de PTT
A1	1938	F	Caucasienne	23	Grossesse	NR (non renseigné)	Fausse-couche	NR	27 ans, lors d'une grossesse 66 ans, à l'occasion d'une cholécystite 68 ans : AVC Hémolyse chronique entre les poussées
A2	1961	F	Caucasienne	37	1 ^{ère} grossesse, à 26SA	Extraction fœtale (26SA), plasmathérapie	MFIU	NR	NR
A3	1968	F	Caucasienne	34	1 ^{ère} grossesse, à 36SA	Extraction fœtale (36SA), plasmathérapie	Vivant	Surveillance clinico-biologique lors de la 2 ^{nde} grossesse, plasmathérapie périnatale, césarienne programmée	NR
A4	1977	F	Caucasienne	26	1 ^{ère} grossesse (35SA)	Accouchement par voie basse	Vivant	Non	36 ans, lors d'une 2 ^{ème} grossesse (insuffisance rénale modérée)
A5	1979	F	Caucasienne	29	1 ^{ère} grossesse (35SA)	Extraction fœtale (36SA)	Décès à 18 jrs de vie (malformation cardiaque)	Plasmathérapie prophylactique lors de la 2 ^{ème} grossesse, accouchement déclenché par voie basse	NR

A6	1980	F	Caucasienne	18	1 ^{ère} grossesse (IVG)	Non	IVG	A l'occasion des autres grossesses	21 ans, lors d'une 2 ^{nde} grossesse (24SA) ; extraction fœtale, plasmathérapie, corticoïdes ; enfant décédé à 3 jours de vie 23 ans, lors d'une 3 ^{ème} grossesse (17SA), plasmathérapie, MF 24SA
A7	1982	F	Caucasienne	31	1 ^{ère} grossesse, à 33SA	Extraction fœtale (33SA), plasmathérapie	Vivant	NR	NR
A8	1983	F	Caucasienne	24	1 ^{ère} grossesse, à 27SA	Extraction fœtale (27SA), plasmathérapie	MFIU	Plasmathérapie prophylactique lors de la 2 ^{ème} grossesse, césarienne programmée	NR
A9	1984	F	Caucasienne	24	1 ^{ère} grossesse, à 30SA	Extraction fœtale (30SA), plasmathérapie	Décès à 6 semaines de vie (prématurité)	Plasmathérapie prophylactique lors de la 2 ^{ème} grossesse, césarienne programmée	NR
A10	1984	F	Caucasienne	25	1 ^{ère} grossesse, à 25SA	Plasmathérapie, extraction fœtale (28SA),	NR	NR	NR
A11	1984	F	Caucasienne	26	1 ^{ère} grossesse, à 38SA	Extraction fœtale, plasmathérapie, corticoïdes	Vivant	NR	NR

Suite du tableau 9

2. Résultats du séquençage des exons et jonctions introns-exons du gène ADAMTS13

Les résultats du séquençage réalisé sont détaillés dans le tableau 10. Nous avons retrouvé la délétion de 29 paires de bases au niveau de la jonction de l'intron 7 et de l'exon 8 précédemment décrite chez le frère P6 de la patiente A8, une délétion d'un nucléotide occasionnant un décalage du cadre de lecture, deux mutations non-sens (soit 20% des mutations retrouvées), et six substitutions faux-sens (soit 60% des mutations retrouvées). La figure 18 synthétise la distribution des 10 mutations différentes retrouvées. Cinq mutations sont situées au niveau de la moitié N-terminale de la protéine (domaines métalloprotéase, désintégrine, TSP1-1, riche en cystéine, *spacer*), les cinq autres sont situées dans les domaines TSP1 et CUB. Sept patientes sont hétérozygotes composites, et parmi l'une d'entre elles on dénombre trois mutations (A6). L'une des patientes (A1) a une mutation homozygote. Deux patientes ont une seule mutation à l'état hétérozygote (A4 et A9). Il faut noter que la mutation c.3178C>T (p.Ala1060Trp) est retrouvée à l'état hétérozygote chez sept patientes sur dix (les deux patientes A2 et A3, jumelles, sont comptabilisées pour un cas index, ce qui réduit le nombre de patientes à dix).

Les arbres généalogiques sont détaillés sur la figure 19. En ce qui concerne les patients pour lesquels l'étude familiale a été possible, il n'existe pas de mutation *de novo*.

Tableau 10 : Variants retrouvés chez patients avec révélation du PTT à l'âge adulte (hmz : homozygote ; hzt : hétérozygote)

Patient	Mutations					Autres variants relativement fréquents dans la population	
	Intron/ Exon	Variant	Statut	Protéine	Domaine	avec effet délétère	sans effet délétère majeur
A1	Exon 7	c.706G>T	homozygote	p.Gly236Cys	Métalloprotéase		c.1342C>G p.Gln448Glu hzt
A2	Exon 20 Exon 24	c.2434G>T c.3178C>T	hétérozygote hétérozygote	p.Glu812X p.Arg1060Trp	TSP4 TSP1-7		c.19C>T p.Arg7Trp hzt c.1342C>G p.Gln448Glu hzt c.3097G>A p.Ala1033Thr hzt
A3	Exon 20 Exon 24	c.2434G>T c.3178C>T	hétérozygote hétérozygote	p.Glu812X p.Arg1060Trp	TSP4 TSP1-7		c.19C>T p.Arg7Trp hzt c.1342C>G p.Gln448Glu hzt c.3097G>A p.Ala1033Thr hzt
A4	Exon 24	c.3178C>T	hétérozygote	p.Arg1060Trp	TSP1-7	c.1852C>G p.Pro618Ala hzt	c.19C>T p.Arg7Trp hzt c.1342C>G p.Gln448Glu hzt c.2195C>T p.Ala732Val hzt c.3097G>A p.Ala1033Thr hzt
A5	-	-	-	-	-	c.1852C>G p.Pro618Ala hmz	c.19C>T p.Arg7Trp hmz c.1342C>G p.Gln448Glu hmz c.2195C>T p.Ala732Val hmz
A6	Exon 3 Exon 16 Exon 24	c.283G>C c.1892C>T c.3178C>T	Hétérozygote Hétérozygote hétérozygote	p.Ala95Pro p.Ala631Val p.Arg1060Trp	Métalloprotéase <i>Spacer</i> TSP1-7		c.19C>T p.Arg7Trp hzt c.3097G>A p.Ala1033Thr hzt
A7	Exon 3 Exon 24	c.262G>C c.3178C>T	Hétérozygote hétérozygote	p.Val88Leu p.Arg1060Trp	Métalloprotéase TSP1-7	c.1852C>G p.Pro618Ala hzt	c.19C>T p.Arg7Trp hzt c.1342C>G p.Gln448Glu hzt c.2699 C>T p.Ala900Val hzt c.3097G>A p.Ala1033Thr hzt
A8	Exon 8 Exon 19	c.825-10_843del29 c.2272T>C	Hétérozygote Hétérozygote	p. ? p.Cys758Arg	Désintégrine TSP1-3		c.1342C>G p.Gln448Glu hmz
A9	Exon 24	c.3178C>T	Hétérozygote	p.Arg1060Trp	TSP1-7	c.1852C>G p.Pro618Ala hzt	c.19C>T p.Arg7Trp hzt c.1342C>G p.Gln448Glu hzt c.2195C>T p.Ala732Val hzt c.3097G>A p.Ala1033Thr hzt
A10	Exon 24 Exon 25	c.3178C>T c.3313C>T	Hétérozygote Hétérozygote	p.Arg1060Trp p.Gln1105X	TSP1-7 TSP1-8		c.19C>T p.Arg7Trp hzt c.3097G>A p.Ala1033Thr hzt
A11	Exon 20 Exon 24	c.2455delG c.3178C>T	Hétérozygote Hétérozygote	p.Ala819LeufsX24 p.Arg1060Trp	TSP4 TSP1-7		c.19C>T p.Arg7Trp hzt c.3097G>A p.Ala1033Thr hzt

Figure 18: Variants retrouvés chez les patients atteints de PTT révélé à l'âge adulte

Variants exprimés dans des recombinants*, mutations non-sens, polymorphismes non synonymes

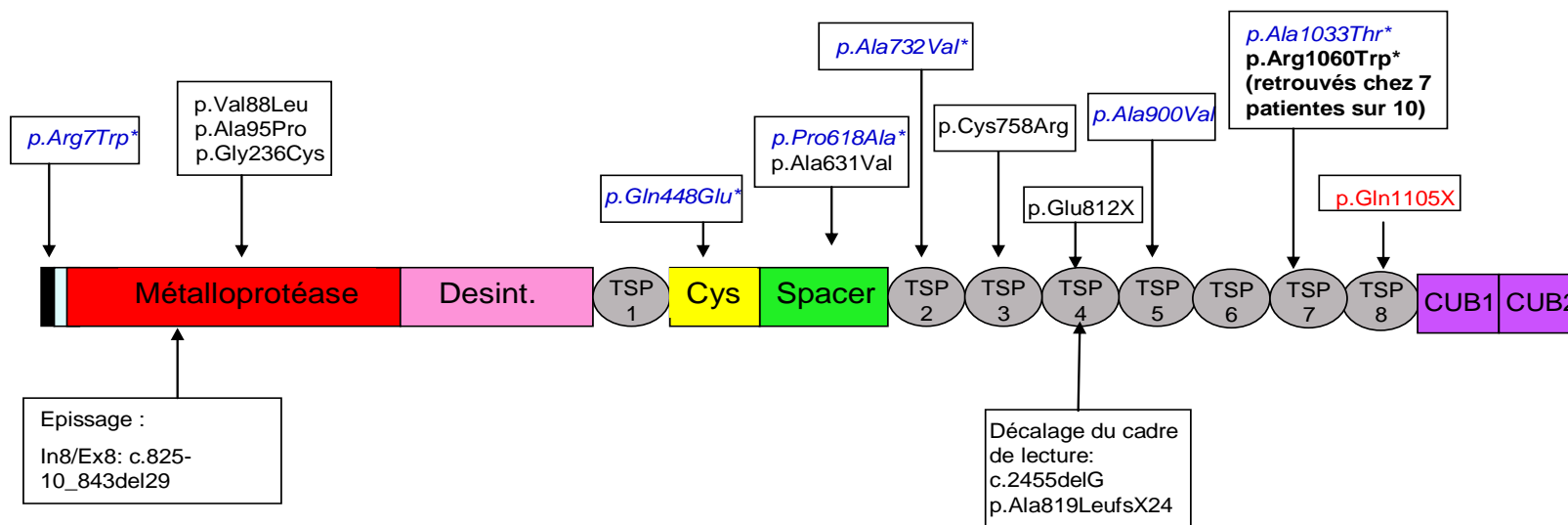
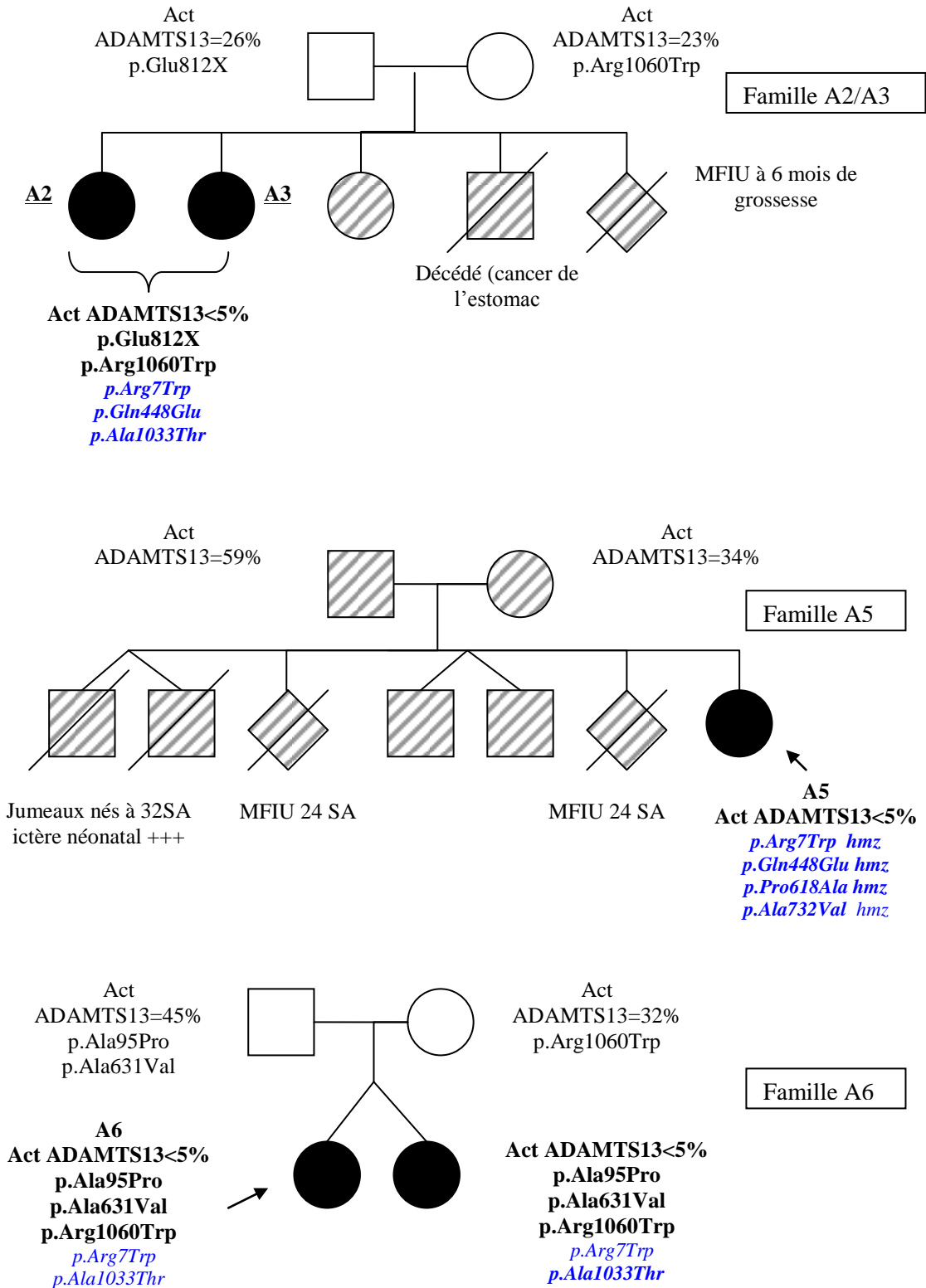


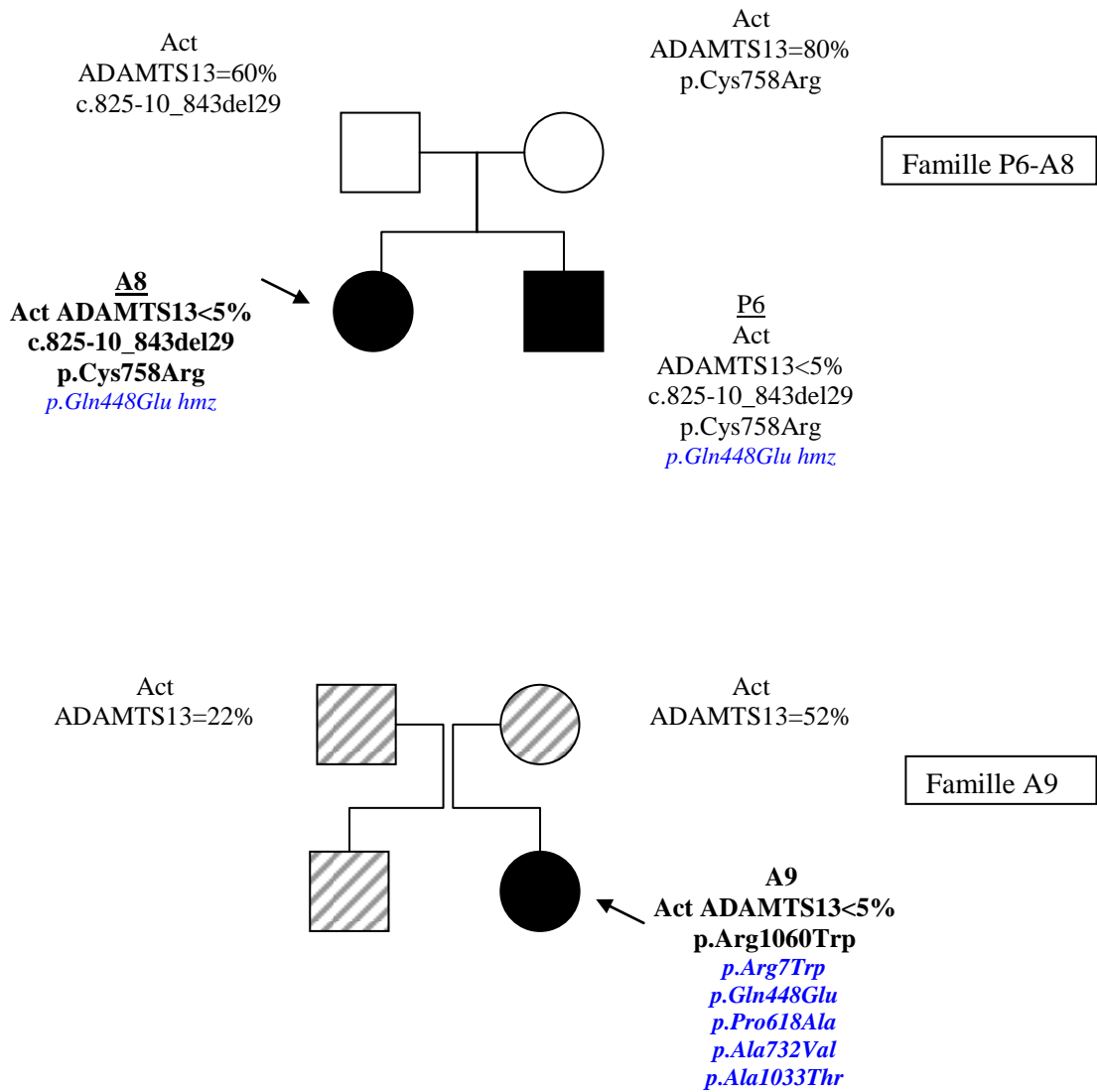
Figure 19: Arbres généalogiques des patients atteints de PTT révélé à l'âge adulte

(Ne sont représentés que les arbres généalogiques des familles dont nous disposons des informations)

- Patients atteints de PTT
- ▨ Patients avec activité ADAMTS13 < 5% dont on ignore s'ils ont développé des symptômes
- Apparentés dont nous ne disposons pas de l'ADN



Suite figure 19



V. DISCUSSION

A. Etude de l'effet délétère des variants retrouvés

1. Cohorte de patients avec PTT révélé pendant l'enfance

a) Mutations décrites dans la littérature

Quatorze mutations retrouvées dans notre cohorte de patients ont déjà été décrites dans la littérature (Tableau 11). Six mutations faux-sens ont fait l'objet d'études *in vitro* par transfection de vecteurs contenant l'ADN complémentaire (ADNc) d'ADAMTS13 muté dans deux types de cellules. Toutes les mutations sont associées à une sécrétion diminuée ou nulle de la protéase et une activité diminuée voire indétectable, ce qui constitue des arguments décisifs en faveur d'un effet délétère de ces mutations et de leur responsabilité dans le phénotype observé. Une mutation non-sens a été décrite dans l'article de Shibagaki *et al.*⁷⁰, elle aboutit à un codon de terminaison au niveau du domaine CUB-1. La présence d'un codon de terminaison prématuré aboutit probablement à la destruction de l'ARN messager par le processus du NMD (*non-sens mediated mRNA decay*), dont le déclenchement nécessite 2 signaux : le codon de terminaison prématuré et l'existence d'une marque de jonction exon-exon en 3' de celui-ci. Deux mutations faux-sens ont été décrites dans l'article de Levy *et al.*²⁹ de 2001. Ces mutations n'ont pas été étudiées *in vitro*, cependant leur localisation dans une région très conservée ainsi que leur absence dans des sujets témoins, arguaient pour un effet délétère de ces mutations. Neuf mutations retrouvées dans les patients de notre cohorte ont déjà fait l'objet d'une publication⁷¹, dont quatre ont été étudiées *in vitro*⁷². L'une est une délétion de 29 nucléotides (dix nucléotides de l'intron 7 et dix-neuf nucléotides du début de l'exon 8) aboutissant probablement à un saut de l'exon 8 par absence d'un site accepteur d'épissage. La mutation d'épissage c.1309-1G>A, de la même façon, conduit selon toute vraisemblance à un saut de l'exon 12. La mutation c.3254_3255delCT génère un décalage du cadre de lecture, puis un codon de terminaison en position 1097, dans le domaine TSP1-8, qui fait probablement intervenir le processus NMD. Enfin, les variants faux-sens p.Cys758Arg et p.Cys908Ser seront discutés dans le tableau 14.

Tableau 11: Mutations de la cohorte de patients atteints de PTT durant l'enfance, décrites dans la littérature internationale

Mutations	Domaine	Etude in vitro (recombinants)			
		Cellules	Sécrétion	Activité ADAMTS13	Référence
p.Ser203Pro	Métalloprotéase	Hela COS-7	21% 18%	- indéetectable	Veyradier <i>et al.</i> 2004 ⁷¹ Hommais <i>et al.</i> 2007 ⁷²
p.Arg268Pro	Métalloprotéase	Hela COS-7	38% 25%	- indéetectable	
p.Arg507Gln	Riche en cystéine	Hela COS-7	indéetectable 1,25%	- indéetectable	
p.Ala596Val	<i>Spacer</i>	Hela COS-7	17% 20%	- rVWF-WT: indéetectable FRETS- VWF73 : 30%	
p.Arg692Cys	TSP1-2	NR (non réalisé)	NR	NR	Levy <i>et al.</i> 2001 ²⁹
p.Cys758Arg	TSP1-3	NR	NR	NR	Veyradier <i>et al.</i> 2004 ⁷¹
p.Cys908Ser	TSP1-5	NR	NR	NR	Veyradier <i>et al.</i> 2004 ⁷¹
p.Cys1024Gly	TSP1-7	NR	NR	NR	Levy <i>et al.</i> 2001 ²⁹
p.Arg1206X	CUB-1	NR	NR	NR	Shibagaki <i>et al.</i> 2006 ⁷⁰
p.Arg1219Trp	CUB-1	HEK293/ Drosophila S2	indéetectable	62%	Donadelli <i>et al.</i> 2006 ⁶⁶
c.825-10_843del29	Métalloprotéase	NR	NR	NR	Veyradier <i>et al.</i> 2004 ⁷¹
p.1309-1G>A	Riche en cystéine	NR	NR	NR	
c.3254_3255delCT p.Ser1085CysfsX12	TSP1-8	NR	NR	NR	
c.4143dupA p.Glu1382ArgfsX6	CUB-2	COS-7 HEK293	14% 4%	85% 10%	Pimanda <i>et al.</i> 2004 ⁷⁴ Garagiola <i>et al.</i> 2008 ⁶³

b) Mutations non décrites dans la littérature

Dix-huit mutations retrouvées dans cette première cohorte pédiatrique n'ont jamais été décrites dans la littérature : il s'agit de trois mutations non-sens, sept mutations d'épissage, deux duplications d'un nucléotide créant un décalage du cadre de lecture et un codon de terminaison prématuré, et six mutations faux-sens. Dans un souci de clarté, les conséquences probables de ces mutations sont rassemblées dans les tableaux 12 et 14.

Les mutations non-sens et les duplications engendrant un décalage du cadre de lecture aboutissent certainement à une destruction de l'ARNm par le NMD et par conséquent à une absence de sécrétion de la protéine. Les mutations d'épissage situées au niveau des sites donneurs (en +1 et +2 après la fin d'un exon) et accepteurs (en -1 et -2 avant le début de l'exon) sont considérées de façon consensuelle comme très probablement délétères pour la fonction protéique. Ces mutations sont, associées à une seconde mutation sur l'autre allèle, sans doute responsables du phénotype observé chez les patients. Les mutations c.330+3G>C et c.687-7C>A sont responsables de création de nouveaux sites d'épissage selon les algorithmes bioinformatiques utilisés dans le service, disponibles sur le logiciel Alamut®. En effet, *SpliceSitefinder-like*, *MaxEntScan* et *NNSplice* prédisent l'abolition de l'épissage en 5' de l'intron 3 pour c.330+3. En ce qui concerne le variant c.687-7, *SpliceSitefinder-like*, *MaxEntScan*, *NNSplice* et *Human Splice Finder* (<http://www.umd.be/HSF/>) prédisent un épissage 5 nucléotides avant le début de l'exon, induisant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon de terminaison prématuré. Cependant, afin de prouver la réalité de ces prédictions, une étude « minigène » va être réalisée à Lyon (Dr Bozon) par transfection de vecteur contenant une partie du gène avec le variant muté dans des cellules, et étude des produits ARN issus de l'épissage.

Pour éliminer la possibilité de polymorphismes rares, nous devons vérifier l'absence des variants non décrits retrouvés dans nos deux cohortes chez au moins 200 sujets sains, théoriquement de même origine ethnique, ce qui paraît difficilement réalisable pour tous les patients de la cohorte.

Tableau 12: Conséquences probables des mutations non-sens, des duplications et des mutations d'épissage retrouvées

Mutation	Domaine	Conséquence probable	
p.Trp470X	Riche en cystéine	STOP en position 470	Activation du NMD et destruction de l'ARNmessenger
p.Glu735X	TSP1-2	STOP en position 735	
p.Gln802X	TSP1-3	STOP en position 802	
c.22dupG p.Ala8GlyfsX131	Peptide signal	Décalage du cadre de lecture entraînant un STOP	
c.1908dupG p.Leu637AlafsX18	Spacer	Décalage du cadre de lecture entraînant un STOP	
c.687-7C>A	Métalloprotéase	Prédiction bioinformatique d'épissage 5 nucléotides avant le début de l'exon	Décalage du cadre de lecture et codon STOP prématuré, puis activation du NMD
c.330+3G>C	Métalloprotéase	Prédiction bioinformatique de l'abolition de l'épissage en 5' de l'intron 3	Saut d'exon ou rétention d'intron, ou création d'un site cryptique d'épissage
c.988-2A>G	Désintégrine-like	Absence du site accepteur d'épissage de l'intron 8	
c.1584 +2T>A	Riche en cystéine	Absence du site donneur d'épissage de l'intron 13	
c.1585-1G>C	Riche en cystéine	Absence du site accepteur d'épissage de l'intron 13	
c.2104+1G>A	TSP1-2	Absence du site donneur d'épissage de l'intron 17	
c.3892+1G>A	CUB-1	Absence du site donneur d'épissage de l'intron 27	

Les variants faux-sens conduisent à un changement d'un acide aminé. La conséquence sur la fonction protéique est plus difficile à prédire. Idéalement, une étude fonctionnelle réalisée *in vitro*, semblable à celles réalisées pour affirmer le caractère délétère des mutations décrites dans la littérature, serait à envisager ultérieurement. Toutefois, dès à présent, de la nature des acides aminés, de la conservation de ces acides aminés parmi les espèces, et de prédictions bioinformatiques quant aux conséquences de ces substitutions faux-sens, peuvent émaner des arguments en faveur d'un caractère délétère de la mutation sur la fonction protéique. La **distance de Grantham** permet d'évaluer la différence de composition, de polarité, et de volume moléculaire entre deux acides aminés, sur une échelle de 0 à 215. La **conservation inter-espèce** a été évaluée à l'aide du site *Ensembl* (www.Ensembl.org) parmi 8 espèces de mammifères considérées : l'homme, le chimpanzé, l'orang-outan, le macaque, le chien, la vache, le rat et la souris. Les données prédictives de trois sites sur l'effet de la substitution d'acides aminés ont été confrontées (Tableau 13). *Align GVGD* (<http://agvgd.iarc.fr/>) utilise la distance de Grantham, et la variation de Grantham qui est liée à la conservation inter-espèce de cet acide aminé grâce à des alignements de séquence. Il classe donc la mutation de la catégorie C0, très probablement non délétère, à la catégorie C65, très probablement délétère. *SIFT (Sorting Intolerant from tolerant)* (<http://sift.jcvi.org/>) est basé sur des alignements de séquence et propose des scores qui correspondent à une substitution non tolérée à tolérée. Le site *Polyphen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) considère la conservation au cours de l'évolution, les différences physico-chimiques, la position de la substitution par rapport à des domaines fonctionnels ou des caractéristiques de structure. Ces données sont rassemblées dans les tableaux 13 et 14.

Tableau 13 : Logiciels de prédiction de l'effet des variants faux-sens utilisés

Logiciels	Score/classement	Signification
<i>Align GVGD</i>	C0 à C65	C0 : n'interfère probablement pas sur la fonction protéique à C65 : interfère très probablement sur la fonction protéique
<i>Polyphen-2</i>	0 à 1	Effet probablement non délétère Effet probablement délétère
<i>SIFT</i>	0 à 0,05 0,051 à 0,1 0,101 et 0,2 0,201 à 1	Substitution non tolérée Substitution probablement non tolérée Limite Substitution tolérée

Tableau 14: Variants faux-sens et conséquences prédites par bioinformatique

Variants	Domaine	Conservation de l'acide aminé (8 espèces)	Distance de Grantham de 0 à 215	<i>Align GVGD</i>	<i>PolyPhen-2</i>	<i>SIFTt Align Sequences</i>
p.Val282Leu	Métalloprotéase	Faiblement conservé	32	C0 (toléré)	0,003 (toléré)	1 (toléré)
p.Cys438Arg	TSP1-1	Hautement conservé	180	C0 (toléré)	1 (délétère)	0.01 (délétère)
p.Leu443pro	Riche en cystéine	Hautement conservé	98	C65 (délétère)	0,954 (délétère)	0.0 (délétère)
p.Cys548Phe	Riche en cystéine	Hautement conservé	205	C65 (délétère)	0,999 (délétère)	0.0 (délétère)
p.Cys695Trp	TSP1-2	Hautement conservé	215	C65 (délétère)	0,999 (délétère)	0.0 (délétère)
p.Asp1362Val	CUB-2	Hautement conservé	152	C65 (délétère)	0,999 (délétère)	0.0 (délétère)
p.Cys758Arg (<i>Veyradier et al</i> ⁷¹)	TSP1-3	Hautement conservé	180	C0 (toléré)	0,998 (délétère)	0.14 (limite)
p.Cys908Ser (<i>Veyradier et al</i> ⁷¹)	TSP1-5	Hautement conservé	112	C65 (délétère)	0,999 (délétère)	0.0 (délétère)

La mutation p.Val282Leu, bien que située dans le domaine métalloprotéase, apparaît comme probablement non délétère pour la fonction protéique au vu des données considérées. En effet, l'acide aminé valine est peu conservé au sein des espèces, la différence physico-chimique entre la valine et la leucine est peu importante, et les trois sites prédictifs annoncent une tolérance de la mutation. Les deux frères P21/P22, qui possèdent cette mutation, ont par ailleurs deux autres mutations (p.Leu443Pro et p.Trp470X) qui sont, selon les mêmes données, plus délétères et plus enclines à expliquer le phénotype de PTT.

La mutation p.Cys438Arg est probablement délétère, car l'acide aminé cystéine est très conservé, la distance de Grantham entre la cystéine et l'arginine est importante, et deux sites sur trois prédisent un effet délétère de la substitution. De plus, le domaine TSP1-1 est requis pour la reconnaissance et le clivage du VWF par ADAMTS13. Une étude fonctionnelle permettrait de statuer sur le caractère délétère de cette mutation.

Les données concernant la mutation p.Cys758Arg, située dans le domaine TSP1-3, sont plus partagées. Ainsi, la cystéine est très conservée à cette position, l'écart physico-chimique entre la cystéine et l'arginine est important, mais deux sites sur trois annoncent un effet délétère peu probable pour cette mutation. La structure particulière de la cystéine qui permet la création de pont disulfure est un argument en faveur de son caractère délétère. Cependant, la fonction du domaine TSP1-3 est encore mal connue pour l'instant. Cette mutation n'a pas été retrouvée chez 100 sujets témoins⁷¹. Dans la famille P6/A8, la mutation ségrège avec la pathologie, en association avec la délétion de 29 nucléotides entre l'intron 7 et l'exon 8. Une étude fonctionnelle permettrait également de statuer sur le caractère délétère de cette mutation.

Les autres substitutions faux-sens (p.Leu443Pro, p.Cys548Phe, p.Cys695Trp, p.Cys908Ser et p.Asp1362Val) sont, selon les données bioinformatiques considérées, probablement délétères pour la fonction de la protéase ADAMTS13. Deux variants sont situés dans le domaine riche en cystéine, qui est nécessaire pour la reconnaissance et le clivage du VWF, un variant est situé dans le domaine CUB, et un autre dans le domaine TSP1-5, qui seraient impliqués dans la reconnaissance du VWF dans la circulation. Le variant p.Cys695Trp se trouve dans le domaine TSP1-2, dont la fonction est mal connue pour l'instant.

Les sujets atteints de PTT à révélation pendant l'enfance sont donc tous hétérozygotes composites ou homozygotes pour une mutation, ce qui, par le caractère délétère probable de ces mutations, peut expliquer le phénotype observé, excepté le patient P14 qui possède seulement une mutation à l'état hétérozygote, ce dont nous discuterons plus tard.

c) Polymorphismes

Le patient P23, atteint de PTT, possède deux duplications occasionnant un décalage du cadre de lecture et probablement une destruction de l'ARN messager par le NMD. Sa sœur et son père ont chacun l'une de ces mutations, à l'état hétérozygote, et ont cependant une activité ADAMTS13 inférieure à 5%, même si, à priori, ils n'ont pas présenté de symptômes de PTT pour l'instant (Figure 20). Le séquençage du gène ADAMTS13 chez la sœur n'a pas retrouvé d'autres mutations pouvant expliquer le phénotype. Cependant les polymorphismes non synonymes p.Arg7Trp, p.Gln448Glu, p.Pro618Ala et p.Ala732Val sont retrouvés chez la sœur et le père.

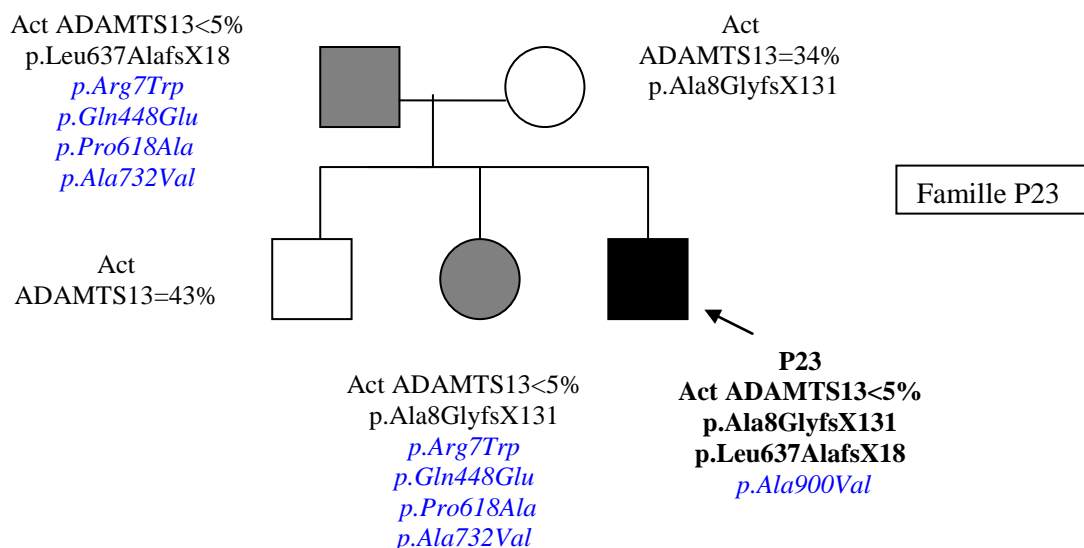


Figure 20: Arbre généalogique de la famille du patient P23

■ Patients atteints de PTT ■ Patients avec Act ADAMTS13<5% dont on ignore s'ils ont développé des symptômes

(mutations, *polymorphismes non synonymes*)

Il existe en effet de nombreux polymorphismes non-synonymes dans le gène ADAMTS13, qui sont détaillés sur la figure 13. Deux polymorphismes, p.Pro475Ser et p.Pro618Ala, ont fait l'objet d'études *in vitro* et ont été associés à des baisses de sécrétion et/ou d'activité de la protéase. Le polymorphisme p.Pro475Ser est fréquent au sein de la population japonaise (fréquence allélique de 5,1% ^{61, 62}), et est associé à une activité ADAMTS13 très réduite. Le polymorphisme p.Pro618Ala est lui aussi répandu (fréquence allélique de 9,2% ⁶¹) et associé à une sécrétion de 27% par rapport à la protéine sauvage et une activité de 14% *in vitro*. Il faut donc considérer les polymorphismes dans l'interprétation des résultats du séquençage. En effet, l'article de Plaimauer *et al.* 2006 ⁶² a pour sujet l'étude des polymorphismes non-synonymes et de leur association sur un même allèle, ou avec une substitution faux-sens. Les résultats de cette étude sont rassemblés dans le tableau suivant :

Construct	Percentage of wt ADAMTS13			
	Antigen level		Activity level	
	Mean	SEM	Mean	SEM
Vector	ND	—	ND	—
WT	100	—	100	—
W7	99	5	86	8
E448	95	8	75	8
A618	27	4	14	1
V732	60	5	71	4
W1336	23	3	12	1
A-V	7	1	4	0
W ₁ -A	35	2	9	2
W ₁ -V	63	12	75	15
E-A	67	5	28	6
V-W ₂	18	2	4	1
E-A-V	26	2	15	1
W ₁ -A-V	25	2	12	1
A-V-W ₂	4	0	ND	—
W ₁ -E-A	63	13	32	2
W ₁ -E-W ₂	12	1	7	1
W ₁ -E-A-V	80	8	40	4
W ₁ -A-V-W ₂	ND	—	ND	—
W ₁ -E-A-V-W ₂	ND	—	ND	—
X44	ND	—	ND	—
X44/W ₁ -E-A-V-W ₂	ND	—	ND	—

Tableau 15 : Antigène et activité ADAMTS13 obtenus dans le milieu des cellules exprimant des variants (D'après Plaimauer *et al.* 2006 ⁶²)

Ces variants sont les suivants : p.Arg7Trp (W7 ou W₁), p.Gln448Glu (E448 ou E), p.Pro618Ala (A618 ou A), Ala732Val (V732 ou V), Arg1336Trp (W1336 ou W₂) et p.Gln44X (X44) seuls ou en association. L'abréviation SEM signifie *Standart Error of the Mean*

D'après cette étude, les polymorphismes p.Arg7Trp et p.Gln448Glu seuls sont associés à une sécrétion et une activité quasi-normales. Le polymorphisme p.Ala732Val est associé à une légère baisse de sécrétion et à une activité maintenue à 71% ; et p.Pro618Ala est associé, comme nous l'avons évoqué précédemment, à une sécrétion de 27% et une activité de 14%. Pourtant, situés sur le même allèle, les effets de p.Pro618Ala et p.Ala732Val « s'additionnent » et induisent une sécrétion de 7% et une activité de 4%. En revanche, p.Arg7Trp et Gln448Glu semblent diminuer l'effet délétère du couple p.Pro618Ala et p.Ala732Val puisque les haplotypes p.Arg7Trp-p.Pro618Ala-p.Ala732Val et Gln448Glu-p.Pro618Ala-p.Ala732Val engendrent une sécrétion respective de 25 et 26% et une activité de 12 et 15%. De plus, l'association des quatre polymorphismes normalise la sécrétion à 80% et augmente significativement l'activité de la protéase à 40%. L'hypothèse émise par les auteurs est que la fréquence allélique de p.Pro618Ala étant élevée, son association à p.Arg7Trp et/ou p.Gln448Glu permettrait de moduler son effet délétère et de restaurer un peu la sécrétion et l'activité de la protéase. Il est vrai que, dans nos deux cohortes, p.Pro618Ala est toujours associé à ces deux polymorphismes, et pour un patient, à p.Gln448Glu seul.

Ainsi, en ce qui concerne le phénotype de la sœur et du père de P23, l'haplotype p.Arg7Trp-p.Gln448Glu-p.Pro618Ala-p.Ala732Val génère peut-être une baisse de l'activité d'ADAMTS13 à environ 40%, ce qui, en association avec la duplication sur l'autre allèle et la destruction de l'ARNm correspondant, suffit à provoquer le phénotype observé (activité ADAMTS13<5%).

Le tableau 16 recense les données bioinformatiques relatives aux polymorphismes faux-sens de la cohorte. Un polymorphisme que nous avons retrouvé dans notre cohorte de cas pédiatriques n'a pas été étudié *in vitro* : il s'agit de p.Arg625His. L'acide aminé arginine est hautement conservé, mais l'écart physico-chimique entre l'arginine et l'histidine est faible (distance de Grantham à 29). Deux sites (*Polyphen-2* et *SIFT Align Sequences*) prédisent un effet délétère de cette substitution, et *Align GVGD* annonce une altération de la fonction protéique peu probable. Une analyse *in vitro* pourrait peut-être fournir des arguments plus tangibles quant à l'effet de ce polymorphisme, qui est peu fréquent dans nos deux cohortes.

Le polymorphisme p.Ala1033Thr est annoncé comme probablement délétère par trois sites de prédiction bioinformatique. Cependant, l'article de Tao *et al*⁶⁸, qui publie les résultats

d'une étude *in vitro*, montre que la sécrétion et l'activité ADAMTS13 du variant sont normales.

Pour les autres polymorphismes, il existe une bonne corrélation entre les prédictions bioinformatiques et les études menées sur les protéines recombinantes correspondantes.

Tableau 16: Polymorphismes non-synonymes de la cohorte de PTT révélés pendant l'enfance

Polymorphisme faux-sens (et domaines)	Conservation de l'acide aminé (8 espèces)	Distance de Grantham de 0 à 215	<i>Align GVGD</i>	<i>PolyPhen-2</i>	<i>SIFT Align Sequences</i>
<i>p.Arg7Trp</i> (peptide signal)	Faiblement conservé	101	C0 (toléré)	inconnu	?
<i>p.Gln448Glu</i> (riche en cystéine)	Faiblement conservé	29	C0 (toléré)	0 (toléré)	1 (toléré)
<i>p.Pro618Ala</i> (<i>spacer</i>)	Hautement conservé	27	C25 (probablement toléré)	0,998 (délétère)	0 (délétère)
<i>p.Ala732Val</i> (TSP1-2)	Hautement conservé	64	C65 (délétère)	0,068 (toléré)	0 (délétère)
<i>p.Ala900Val</i> (TSP1-5)	Faiblement conservé	64	C0 (toléré)	0 (toléré)	0,46 (toléré)
<i>p.Ala1033Thr</i> (TSP1-7)	Hautement conservé	58	C55 (probablement délétère)	0,712 (possiblement délétère)	0 (délétère)
<i>p.Arg625His</i> (<i>spacer</i>)	Hautement conservé	29	C25 C25 (probablement toléré)	0,999 (délétère)	0 (délétère)

2. Cohorte de patients avec PTT révélé à l'âge adulte

a) Mutations décrites dans la littérature

Trois mutations ont déjà été décrites dans la littérature (Tableau 17). Les mutations p.Cys758Arg et c.825-10_843del29 ont déjà été discutées précédemment. La mutation p.Arg1060Trp apparaît comme délétère au décours d'études *in vitro*^{65, 68} notamment par la baisse significative de la sécrétion d'ADAMTS13. Dans l'article de Tao *et al.* 2006⁶⁸, il est spécifié que l'activité ADAMTS13 du recombinant contenant p.Arg1060Trp est normale dans des conditions de flux, alors qu'elle est de 35% dans des conditions statiques. La fréquence de cette mutation dans la cohorte de patients avec un PTT révélé à l'âge adulte est importante, puisqu'elle est retrouvée chez sept patientes sur dix. L'étude publiée via l'article de Camilleri *et al.* 2008⁶⁵, qui avait pour objet le séquençage de 53 patients atteints de PTT à l'âge adulte, a retrouvé cette même mutation chez 6 patients, dont trois patientes qui ont déclenché un PTT à l'occasion de la grossesse.

Tableau 17: Mutations de la cohorte de patients avec PTT révélé à l'âge adulte décrites dans la littérature

Mutations décrites dans la littérature	Domaine	Etude <i>in vitro</i>			
		cellules	sécrétion	activité	Référence
p.Arg1060Trp	TSP1-7	HeLa	11%	Normale en condition de flux, 35% en condition statique	Tao <i>et al.</i> , 2006 ⁶⁸
		HEK293	Réduction sévère (<5%)	100%	Camilleri <i>et al.</i> 2008 ⁶⁵
p.Cys758Arg	TSP1-3	NR (non réalisé)	NR	NR	Veyradier <i>et al.</i> 2004 ⁷¹
c.825-10_843del29	Métalloprotéase	NR	NR	NR	Veyradier <i>et al.</i> 2004 ⁷¹

b) Mutations non décrites dans la littérature

Sept mutations, non décrites dans la littérature, ont été retrouvées dans la cohorte de patientes atteinte de PTT à l'âge adulte. Il s'agit de deux mutations non-sens, une duplication d'un nucléotide créant un décalage du cadre de lecture et un codon de terminaison en position 843, et quatre mutations faux-sens. Les mutations non-sens et la duplication sont probablement délétères par intervention du NMD (Tableau 18).

Tableau 18: Mutations non-sens et décalage du cadre de lecture non décrites dans la littérature dans la cohorte de patients avec PTT révélé à l'âge adulte

Mutations	Domaines	Conséquences probables	
p.Glu812X	TSP1-4	Codon STOP en position 812	Activation du NMD et destruction de l'ARN messager
p.Gln1105X	TSP1-8	Codon STOP en position 1105	
c.2455delG p.Ala819LeufsX24	TSP1-4	Décalage du cadre de lecture entraînant un STOP	

Trois substitutions faux-sens non décrites dans la littérature sont situées dans le domaine métalloprotéase, et une dans le domaine *spacer*. Deux d'entre elles, p.Val88Leu et p.Gly236Cys, sont probablement délétères car les acides aminés valine et glycine sont hautement conservés, et la prédiction de deux sites sur trois (*Polyphen-2* et *SIFT Align Sequences*) sont en faveur d'une altération de la fonction protéique (Tableau 19).

En revanche, pour les mutations p.Ala95Pro et p.Ala631Val, bien qu'elles soient situées dans des domaines fonctionnels importants (métalloprotéase et *spacer*), un effet délétère s'avère moins probable. En effet, les deux acides aminés substitués sont modérément ou peu conservés, la distance de Grantham est faible (27 et 64), et seulement un site (respectivement *Polyphen-2* ou *SIFT Align Sequences*) annonce un effet possiblement délétère pour p.Ala631Val et p.Ala95Pro. Les deux mutations sont situées sur un même allèle chez la patiente A6, qui possède sur l'autre allèle la mutation p.Arg1060Trp. On peut donc supposer que l'association des deux mutations fasse apparaître un effet délétère, et explique, avec la mutation p.Arg1060Trp sur l'autre allèle, le phénotype observé.

Tableau 19: Variants faux-sens non décrits dans la littérature, dans la cohorte de patients avec PTT révélé à l'âge adulte

Mutations non décrites dans la littérature	Domaine	Conservation de l'acide aminé (8 espèces)	Distance de Grantham de 0 à 215	<i>Align GVD</i>	<i>PolyPhen-2</i>	<i>Sift Align Sequences</i>
p.Val88Leu	Métalloprotéase	Hautement conservé	32	C25 (probablement toléré)	0,993 (délétère)	0,0 (délétère)
p.Ala95Pro	Métalloprotéase	Modérément conservé	27	C0 (toléré)	0,208 (possiblement délétère)	0,15 (limite)
p.Gly236Cys	Métalloprotéase	Hautement conservé	159	C0 (toléré)	1 (délétère)	0,0 (délétère)
p.Ala631Val	<i>Spacer</i>	Faiblement conservé	64	C0 (toléré)	0,083 (toléré)	0,10 (probablement non tolérée)

c) Polymorphismes modulateurs

Deux patientes ont seulement une mutation p.Arg1060Trp à l'état hétérozygote, associée à de nombreux polymorphismes non-synonymes modulateurs, soit p.Arg7Trp, p.Gln448Glu, p.Pro618Ala, p.Ala732Val et p.Ala1033Thr. Nous ne disposons pas de l'ADN des parents, donc nous ne savons pas comment sont distribués les polymorphismes et la mutation sur les allèles. Si les polymorphismes sont sur le même allèle, une diminution de l'activité ADAMTS13 aux alentours de 40% (Plaimauer *et al.* 2006⁶²) pourrait peut-être, en association avec la mutation sur l'autre allèle, expliquer le phénotype. Si p.Pro618Ala est sur un allèle, alors que la mutation p.Arg1060Trp et tous les autres polymorphismes modulateurs sont sur l'autre allèle, alors p.Pro618Ala sera encore plus délétère selon Plaimauer *et al.*⁶². Ce cas de figure a déjà été décrit dans la littérature dans l'article de Camilleri *et al.*⁶⁵ pour deux patientes qui possédaient chacune la mutation p.Arg1060Trp à l'état hétérozygote, et des polymorphismes modulateurs (soit p.Arg7Trp et p.Ala1033 pour l'une et p.Arg7Trp, p.Gln448Glu, p.Pro618Ala et p.Ala1033Thr pour l'autre). Ces deux patientes avaient une activité ADAMTS13 inférieure à 5%, et ont présenté un premier épisode de PTT à l'âge adulte, à l'occasion d'une grossesse.

Le nombre et la fréquence des polymorphismes non-synonymes sont plus importants dans cette cohorte que dans la précédente. On peut aussi souligner la fréquence importante du polymorphisme p.Ala1033Pro par rapport à la première cohorte, qui est toujours associé à la mutation p.Arg1060Thr. Dans l'article de Camilleri *et al.*⁶⁵, qui décrit la mutation p.Arg1060Trp, le polymorphisme p.Ala 1033Trp lui est aussi systématiquement associé. Il est donc possible qu'il existe un déséquilibre de liaison entre les deux variants, ce qui est vraisemblable étant donné la proximité des deux variants de séquence, et donc de la probabilité de recombinaison plus faible.

B. Relation génotype-phénotype

Les relations génotypes phénotypes sont difficiles à établir dans le PTT héréditaire pour chaque variant, puisque les patients sont majoritairement hétérozygotes composites.

1. PTT révélés dans l'enfance

Au regard de la première cohorte de cas pédiatriques, il existe une relation génotype-phénotype puisque les mutations observées sont associées avec un phénotype de PTT. Cependant, les différences de gravité ne sont pas en rapport avec un type de mutation particulier. Les formes graves avec accident neurologique sont aussi bien associées à des mutations d'épissage, des mutations non-sens ou faux-sens. Il est aussi important de souligner que dans la famille P6/A8, le même génotype est retrouvé chez le frère et la sœur, avec une histoire clinique différente. En effet, le frère présente un premier épisode néonatal, puis une poussée à l'âge de 5 ans, et nécessitera la mise en place d'un traitement, alors que la sœur, ne présente qu'une thrombopénie chronique non étiquetée et une première « vraie » poussée de PTT pendant sa première grossesse, à l'âge adulte. Cette différence de tableau clinique malgré un génotype commun a été bien décrite dans le PTT⁶⁰. Par exemple, deux frères ayant les deux mêmes mutations, ont eu un premier épisode de PTT l'un à 2 ans et l'autre à 21 ans^{27, 64}. Cependant, l'un a le polymorphisme p.Arg7Trp, et l'autre pas. Comme nous l'avons vu précédemment, les polymorphismes pourraient jouer un rôle de modulateur, positif ou négatif, sur l'expression et l'activité de la protéase. Les patients P6 et A8 ont le même polymorphisme p. Gln448Glu ; donc ce n'est pas l'origine de cette différence de phénotype. D'autres facteurs pourraient intervenir, comme par exemple des polymorphismes au niveau du VWF dans les domaines A2 et même CK-D4, qui pourraient moduler la liaison avec ADAMTS13. Il existe en effet de très nombreux polymorphismes dans la partie de l'exon 28 du VWF codant pour le domaineA2.

2. PTT révélé à l'âge adulte

Dans la deuxième cohorte, la fréquence de la mutation p.Arg1060Trp (TSP1-7) est importante (7 patientes sur 10). Cette mutation a été décrite dans quatre articles ^{65 à 68}, et elle n'est associée qu'à des révélations du PTT à l'âge adulte. Elle a été retrouvée à l'état homozygote chez un seul patient, dans les autres cas elle est retrouvée à l'état hétérozygote. Nous avons vu précédemment que cette mutation est associée *in vitro* à une baisse significative de la sécrétion de la protéase. Camilleri *et al.* ⁶⁵ évoquent un possible changement structural induit par la mutation, qui pourrait modifier la disponibilité des sites O-fucosylés situés sur les domaines TSP1, et qui influencent la sécrétion. Par ailleurs, l'activité ADAMTS13 associée au recombinant muté est normale. On peut donc supposer que p.Arg1060Trp, même très peu sécrétée, est fonctionnelle, et maintient un clivage du VWF suffisant pour ne pas déclencher de phénomènes aigus de PTT, jusqu'à l'évènement déclenchant qu'est la grossesse. Dans l'article de Camilleri *et al.* ⁶⁵, trois femmes sur les quatre qui ont la mutation ont présenté un PTT pendant la grossesse. On sait que le PTT peut se déclencher après une infection pendant l'enfance. En ce qui concerne les débuts à l'âge adulte, la grossesse semble être un facteur déclenchant important. On peut expliquer ce phénomène par le fait que le VWF augmente progressivement pendant la grossesse, atteignant son paroxysme au terme, jusqu'à 200-500% de la normale ⁶⁹. De plus, l'activité d'ADAMTS13 baisserait physiologiquement au cours de la grossesse ^{86, 87}. On peut donc imaginer qu'un taux d'ADAMTS13 très faible peut maintenir un clivage du VWF suffisant pour ne pas déclencher de phénomène aigu de PTT pendant l'enfance, mais se trouve « dépassé » par la hausse de VWF pendant la grossesse. Le taux de VWF revient à la normale dans la semaine suivant la délivrance.

Il est intéressant de souligner que les patientes possédant p.Arg1060Trp n'ont présenté un PTT qu'à l'occasion de grossesses, alors que les autres patientes possédant d'autres mutations, A1 et A8, ont développé des signes de PTT en dehors des grossesses. En effet, A1 a présenté une poussée de PTT à l'occasion d'une cholécystite, puis a fait un AVC, et avait une hémolyse chronique entre les poussées. Quant à A8, elle présentait une thrombopénie chronique avant de déclencher un épisode de PTT pendant la grossesse.

La mutation p.Arg1060Trp, recensée jusqu'à présent chez des sujets caucasiens, semble être issue d'Europe du Nord. Ainsi, l'article de Fujimura *et al.* ⁶⁹, qui présente les

résultats du séquençage d'ADAMTS13 chez 9 patientes japonaises atteintes de PTT pendant la grossesse ne retrouve pas la mutation p.Arg1060Trp. Cet article décrit quatre femmes, dont deux sœurs, qui ont manifesté un premier épisode de PTT au cours de leur première grossesse, au Japon. Elles sont toutes hétérozygotes composites pour des mutations différentes, faux-sens, non-sens ou produisant un décalage du cadre de lecture. Par conséquent, le déclenchement du PTT au cours de la grossesse n'est pas l'apanage de la mutation p.Arg1060Trp, mais est associé également à d'autres mutations. Par ailleurs, p.Arg1060Trp n'est pas exclusivement observée lors de grossesse chez des femmes, puisqu'elle a été retrouvée, associée à une autre mutation, chez un homme qui a présenté un PTT de début à l'âge adulte, avec plusieurs poussées ayant nécessité des traitements par échanges plasmatiques ⁶⁸.

C. Comment expliquer le tableau clinique des patients qui ne présentent qu'une seule mutation hétérozygote ou aucune mutation.

Trois patients ne possèdent qu'une seule mutation à l'état hétérozygote (P14, A4 et A9), et une patiente (A5) ne présente aucune mutation localisée dans les 29 exons ni dans les jonctions exons-introns du gène ADAMTS13. Comment expliquer le phénotype de PTT observé chez ces patients ?

1. La patiente A5

a) Grand réarrangement : délétion

La patiente A5 a présenté un premier épisode de PTT pendant sa première grossesse. Le dosage de l'activité ADAMTS13 se révèle indétectable, la recherche d'anticorps anti-ADAMTS13 est négative. Les antécédents de la famille de A5 sont compatibles avec un syndrome d'Upshaw-Schulman, puisque deux frères jumeaux de la patiente sont décédés en période néonatale dans un contexte d'ictère néonatal (Figure 21). La mère de la patiente a une activité ADAMTS13 à 34% compatible avec une mutation hétérozygote, et elle rapporte une

fausse-couche spontanée précoce et une mort fœtale *in utero* à 24SA. Le père a une activité ADAMTS13 à 59%. Chez cette patiente, le séquençage réalisé n'a révélé aucune mutation. Tous les polymorphismes, dont les polymorphismes non synonymes p.Arg7Trp, p.Gln448Glu, p.Pro618Ala et p.Ala732Val, sont retrouvés à l'état homozygote.

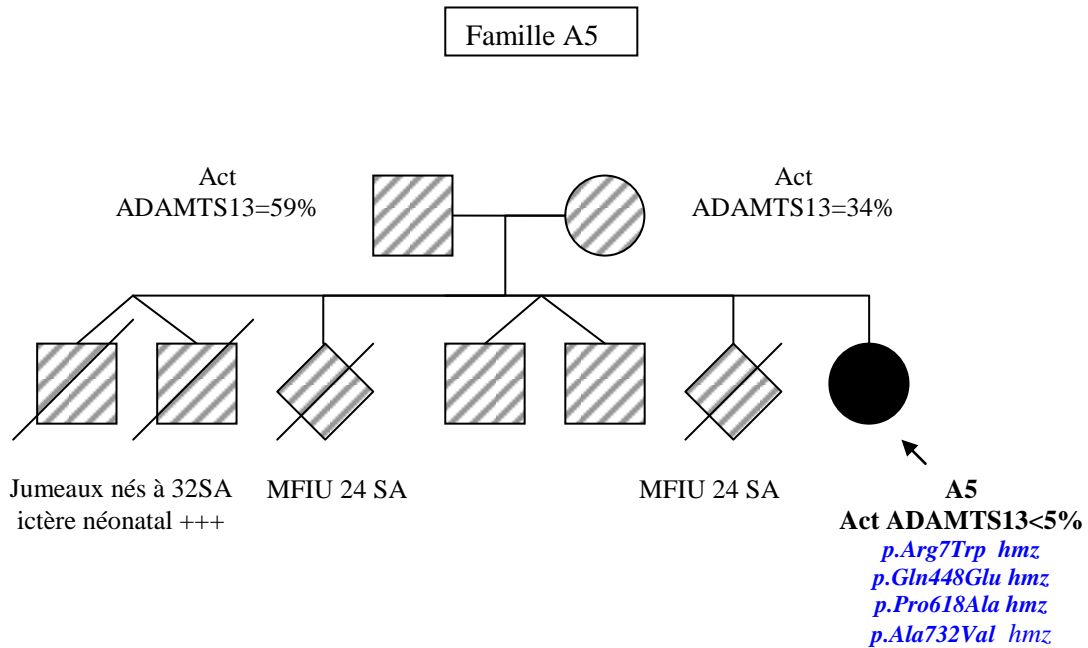


Figure 21: Arbre généalogique de la famille de la patiente A5

■ Patient atteints de PTT ▨ Apparentés dont nous ne disposons pas de l'ADN

(mutations, *polymorphismes non synonymes*)

Tout d'abord, il pourrait exister des grands réarrangements au niveau du gène ADAMTS13, tels des délétions de tout ou d'une partie du gène. Une délétion d'un allèle pourrait être masquée lors du séquençage par l'existence d'un second allèle normal, le seul indice étant le caractère homozygote systématique des polymorphismes correspondant à la région délétée. Or, la patiente A5 présente ces caractéristiques puisque tous les polymorphismes, silencieux ou non-synonymes des régions séquencées, sont homozygotes. Il nous faudra donc déterminer s'il existe une délétion du gène ADAMTS13 ou d'une partie du gène. Des PCR quantitatives sur différentes régions du gène pourront mettre en évidence les régions présentes en deux copies et celles présentes en une seule copie, signant une délétion. L'existence de délétions ou duplications au niveau du gène ADAMTS13 n'a pas été décrite

pour l'instant dans la littérature, mais est toutefois possible. En effet, il existe au sein du gène de « grands » introns, qui sont plus fréquemment siège de grands remaniements au sein du génome.

Au sujet de la patiente A5, si en effet il existe une délétion d'un allèle, alors l'autre, dépourvu de mutation, est siège de polymorphismes non-synonymes (p.Arg7Trp, p.Gln448Glu, p.Pro618Ala et p.Ala732Val). Donc, l'association de ces polymorphismes, conduisant à une baisse d'activité de la protéase, et la délétion de l'autre allèle, pourrait engendrer la baisse d'activité ADAMTS13 observée.

b) Isodisomie parentale du chromosome 9

En ce qui concerne la patiente A5, la seconde hypothèse que nous pouvons évoquer est une disomie uniparentale (plus précisément une isodisomie). Il s'agit de la présence de deux chromosomes d'une même paire issue d'un même parent, l'isodisomie correspondant à la présence de deux copies du même chromosome, et l'hétérodisomie à la présence de copies de deux chromosomes différents. Les mécanismes invoqués pour expliquer la disomie uniparentale sont la réduction de trisomie dans un zygote, la duplication d'un chromosome dans un zygote monosomique, et la fécondation d'un gamète disomique pour une paire chromosomique par un gamète nullosomique pour cette même paire chromosomique. Ce phénomène est très rare, cependant plusieurs cas, impliquant le chromosome 9, ont été rapportés dans la littérature. Une isodisomie maternelle complète du chromosome 9 a déjà été décrite en 2010, chez une patiente atteinte d'hypothyroïdie congénitale, porteuse d'une mutation homozygote du gène FOXE1 (Forkhead box E1) ⁸⁸. Une disomie maternelle partielle du chromosome 9 a été également rapportée dans le cas d'un syndrome de Leigh, une encéphalopathie nécrosante subaiguë ⁸⁹. Des cas de disomie uniparentale ont également été décrits chez des patients atteints de CHH (Cartilage-Hair Hypoplasia), dont le gène responsable est localisé en 9p13 ⁹⁰. Dans le cas de la patiente A5, une isodisomie aboutirait à une homozygotie des polymorphismes observés et à deux allèles exprimant une protéase moins fonctionnelle par rapport à la normale, ce qui pourrait peut-être, à l'occasion d'une grossesse, faire apparaître le phénotype.

2. Les patientes A4 et A9

La patiente A9 a présenté une poussée de PTT lors de sa première grossesse. L'activité ADAMTS13 est inférieure à 5% sur plusieurs prélèvements survenant après l'épisode aigu, et la recherche d'anticorps anti-ADAMTS13 est négative. La patiente A4 a présenté des épisodes de PTT à l'occasion de ces deux grossesses. L'activité ADAMTS13 avait été mesurée à 15% sur un prélèvement réalisé pendant la deuxième grossesse, puis inférieure à 10% sur des prélèvements ultérieurs. La recherche d'anticorps anti-ADAMTS13 est également négative. Ces deux patientes présentent la même mutation p.Arg1060Trp à l'état hétérozygote, ainsi que plusieurs polymorphismes : p.Arg7Trp, p.Gln448Glu, p.Pro618Ala, p.Ala732Val et p.Ala1033Val.

L'hypothèse principale réside dans l'effet délétère des polymorphismes, qui pourrait, associé à une mutation, aboutir à une perte de fonction de la protéine. Comme nous l'avons évoqué précédemment, il est possible que l'haplotype p.Arg7Trp, p.Gln448Glu, p.Pro618Ala, p.Ala732Val, soit associé à une baisse d'activité de 40%. Si la mutation p.Arg1060Trp, associée à p.Ala1033Val, est sur l'autre allèle, alors il est envisageable que la fonction protéique soit altérée. Pour statuer sur la distribution des polymorphismes sur les allèles paternels et maternels, il faudrait étudier le gène ADAMTS13 des parents, dont nous ne disposons pas l'ADN à ce jour. Des cas similaires ont déjà été décrits dans l'article de Camilleri *et al.*⁶⁵ (cf p.74). En outre, l'existence d'une délétion est théoriquement possible, d'autant qu'il existe aussi des polymorphismes présents à l'état homozygote dans certains exons. Il faudra donc éliminer une délétion emportant quelques exons chez ces deux patientes.

3. Le patient P14

Le patient P14 est un enfant d'origine turque, de parents non consanguins, qui a présenté un ictère néonatal, puis une seconde poussée de PTT à l'âge de 10 mois. La survenue de poussées itératives a nécessité la mise en place d'une plasmathérapie prophylactique tous les 15 jours. Il n'a, à priori, pas souffert de troubles neurologiques ou rénaux. Nous avons retrouvé chez ce patient une substitution faux-sens hétérozygote p.Arg1219Trp, et un polymorphisme hétérozygote p.Ala900Val.

a) Anomalies dans des séquences non codantes

(1) Région 5'UTR

Il est possible qu'une anomalie dans la région 5'UTR (*untranslated region*) non séquencée soit à l'origine d'une diminution d'expression de la protéase. En effet, une mutation au niveau de la région 5'UTR survenant au niveau d'un site de liaison d'un facteur transcriptionnel pourrait inhiber voir abolir la transcription. Une mutation de la région promotrice pourrait modifier sa structure secondaire, pouvant ainsi influencer la régulation de la transcription. Une partie de l'extrémité 5'UTR a été séquencée avec l'exon 1, cependant un séquençage exhaustif pourrait être intéressant. En effet plusieurs facteurs de transcription pourraient se fixer en amont de la région séquencée (GATA-1, E2F, MZF1, AP-1, p300, AhR, c-Ets) selon le logiciel *TFSearch* (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

(2) Les introns

Des mutations au niveau intronique hors des régions séquencées pourraient être responsables d'anomalies d'épissage. En effet, une mutation intronique peut créer un site cryptique d'épissage, en faisant apparaître un site accepteur ou donneur d'épissage, et allonger la phase codante. Un séquençage de l'ensemble des introns pourrait donc être envisagé afin de rechercher de telles anomalies.

(3) Régions régulatrices à distance

Il existe des régions régulatrices influençant la transcription des gènes de manière positive ou négative. Ces régions « *enhancer* » ou « *silencer* » peuvent être situées à plusieurs centaines ou milliers de paires de base en 5' ou en 3' du gène. De telles régions ont été identifiées par exemple en 5' du gène *SHOX* (*short stature homeobox gene*), et impliquées dans la survenue de la dyschondrostéose⁹¹. La recherche de mutations affectant ces régions, inconnues pour l'instant dans le cas du gène *ADAMTS13* nécessiterait un séquençage massif autour de la région 9p34.

b) Polymorphismes du VWF

Une dernière hypothèse pour expliquer le phénotype de PTT chez le patient P14, est la présence de variants ou de polymorphismes du VWF, dans des régions qui interagissent avec ADAMTS13, comme par exemple le domaine A2 et les domaines D4-CK. Il pourrait s'agir de variants non délétères pour le fonctionnement du VWF dans l'hémostase primaire, mais qui moduleraient la liaison entre les deux molécules.

VI. CONCLUSION

Le syndrome d'Upshaw-Schulman est une pathologie génétique autosomique récessive rare, engageant le pronostic vital, dont le mécanisme physiopathologique n'a été élucidé que très récemment. Des mutations hétérozygotes composites ou homozygotes du gène ADAMTS13, codant une protéase qui clive les mégamultimères du VWF, ont été impliquées dans la survenue de la maladie.

Le séquençage du gène ADAMTS13 dans deux cohortes de patients atteints de PTT, qui diffèrent par l'âge de début de la pathologie, nous a permis de confirmer le diagnostic de syndrome d'Upshaw-Schulman pour la grande majorité des patients. Nous avons mis en évidence 25 mutations jusqu'à présent non décrites dans la littérature internationale. Des études fonctionnelles pourraient confirmer l'effet délétère des substitutions faux-sens retrouvées dans nos deux cohortes. Par ailleurs, cette étude nous a fourni des arguments supplémentaires en faveur du rôle modulateur des polymorphismes non synonymes sur la sécrétion et la fonction de la protéase, et de la nécessité de les considérer dans l'interprétation du séquençage. Nous avons pu également confirmer l'association forte de la mutation p.Arg1060Trp avec un début de la pathologie à l'âge adulte, comme cela est décrit dans la littérature. Il serait intéressant de confirmer la fréquence importante de la mutation p.Arg1060Trp sur une plus grande cohorte de patients. Cette étude souligne aussi le fait que la grossesse est un facteur déclenchant majeur de PTT et peut mimer une pré-éclampsie grave ou un HELLP-syndrome.

Nous avons soulevé des hypothèses concernant l'absence de mutations dans les régions séquencées pour plusieurs patients, dont certaines devront être investiguées. Cela permettra peut-être de découvrir d'autres mécanismes moléculaires responsables du phénotype de PTT héréditaire, comme par exemple un grand réarrangement, ce qui n'a pour l'instant jamais été décrit dans la littérature.

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Coppo P, Veyradier A. Microangiopathies thrombotiques: physiopathologie, diagnostic et traitement. *Réanimation* 2005 ; 14 :594-603
2. Tsai HM. The molecular biology of thrombotic microangiopathy. *Kidney International* 2006; 70:16-23
3. Copelovitch L, Kaplan BS. The thrombotic microangiopathies. *Pediatr Nephrol* 2008; 23:1761-1767
4. Bouw MC, Dorz N, van Ommen H, Ramakers-van Woerden NL. Thrombotic thrombocytopenic purpura in childhood. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53:537-542
5. Besbas N, Karpman D, Landau D, Loirat C, Proesman W, Remuzzi G, Rizzoni G, Taylor CM, Van de Kar N, Zimmerhackl LB. A classification of hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura and related disorders. *Kidn Intern* 2006; 70:423-431
6. Tsai H-M. The molecular biology of thrombotic microangiopathy. *Kidn Intern* 2006; 70:16-23
7. Moake J. Thrombotic microangiopathies: multimers, metalloprotease and beyond. *Clin Transl Sciences* 2009; 2:366-373
8. Coppo P, Bengoufa D, Veyradier A, Wolf M, Bussel A, Millot GA, et al. Severe ADAMTS13 deficiency in adult idiopathic thrombotic microangiopathies defines a subset of patients characterized by various autoimmune manifestations, lower platelet count and mild renal involvement. *Medicine* 2004; 83:233-244
9. Coppo P. Microangiopathie thrombotique en réanimation ; vers une classification physiopathologique pour des thérapeutiques ciblées. *Réanimation* 2011 ; 20:S320-S331
10. Miller DP, Kaye JA, Shea K, Ziyadeh N, Cali C, Black C, Walker AM. Incidence of thrombotic thrombocytopenic purpura /hemolytic uremic syndrome. *Epidemiology* 2004; 15:208-209.
11. Rock GA, Shumack KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC, Spadoff RA, and the Canadian Apheresis Study Group. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1995; 325:393-397
12. George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: 2010. *Blood* 2010; 116:4060-4069

13. Moschowitz E. An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: an undescribed disease. 1925. Mt Sinai J Med. 2003;70; 352-355
14. Amorosi EL, Ultmann JE. Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of the literature. Medicine 1966; 45:139-159.
15. Schleinitz N, Poullin P, Camoin L, Veit V, Bernit E, Mazodier K, Lefèvre P, Dignat-George F, Kaplanski G, Durand JM, Harlé JR. Le purpura thrombotique thrombocytopenique acquis de l'adulte: actualités. La revue de Médecine interne. 2008; 29: 794-800
16. Sadler J, Moake JL, Miyata T, George JN. Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. Hematology 2004; 407-423
17. Tsai HM. Physiopathology of thrombotic thrombocytopenic purpura. Int J Hematol 2010; 91:1-19
18. Lesesve JF, Salignac S, Lecompte T. Diagnostic des anémies hémolytiques mécaniques : contribution de l'hémogramme. Annales de Biologie Clinique. 2001 ; 59 :551-558
19. Allford SL, Hunt BJ, Rose P, Machin SJ. Guidelines on the diagnosis and management of the thrombotic microangiopathic haemolytic anemias. British Journal of Haematology. 2003; 120:556-573
20. Zheng XL, Kaufman RM, Goodnough LT, Sadler JE. Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS13 metalloprotéase activity, inhibitor level, and clinical outcome in patients with idiopathic and nonidiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 2004; 103:4043-4049
21. Hosler GA, Cusumano AM, Hutchins GM. Thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome are distinct pathologic entities. A review of 56 autopsy cases. Arch Pathol Lab Med 2003; 127:834-839
22. Veyradier A, Obert B, Houllier A, Meyer D, Girma JP. Specific von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases. Blood 2001; 98:1765-1772
23. Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Wenstein MJ, Colannini NM, Azocar J, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrandt factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 1982; 307:1432-1435
24. Coppo P, Vernant JP, Veyradier A, Frémeaux-Bacchi V, Mira JP, Guidet B, Azoulay E, Rondeau E, Bussel A. Purpura thrombotique thrombocytopenique et autres syndromes de microangiopathie thrombotique. EMC Hématologie 2005 ; 2:14-34
25. Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. Blood 1996; 87:4235-44

26. Furlan M, Robles R, Lamie B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996; 87:4223-34
27. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lämmle B. Deficient Activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic Relapsing Thrombotic Thrombocytopenic purpura. *Blood* 1997; 89:3097-3103
28. Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U, Solenthaler M, Lämme B. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Eng J Med* 1998; 339:1578-1584
29. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick Jn, McGee BM, Yang AY, Siemieniack DR, Stark KR, Gruppo R, Sarode R, Shurin SB, Chandrasekaran V, Stabler SP, Sabio H, Bouhassira EE, Upshaw JD Jr, Ginsburg D, Tsai HM. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001; 413:488-494
30. De Meyer SF, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. Von Willebrand factor to the rescue. *Blood* 2009; 113:5049-5057
31. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Biochem* 1998; 67:395-424
32. Dong J, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K, Lopez JA. ADAMTS13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 2002; 100:4033-4039
33. Ruggeri ZM. Platelet adhesion under flow. *Microcirculation* 2009; 16:58-83
34. Dong JF, Moake JL, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K, Lopez JA. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 2002; 100: 4033-4039
35. Dong JF. Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2005; 3:1710-1716
36. Arya M, Anvari B, Romo GM, Cruz MA, Dong JF, McIntire LV, Moake JL, Lopez JA. Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood* 2002;99: 3971-397
37. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, et al. Effects on inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor multimers under flow. *Blood*. 2004; 104: 100-106.

38. Padilla A, Moake JL, Bernardo A, Ball C, Wang Y, Arya M, Nolasco L, Turer N, Berntz MC, Anvari B, Lopez JA, Dong JF. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood*. 2004; 103:2150-2156.
39. Levy GG, Motto DG, Ginsburg D. ADAMTS13 turns 3. 2005; 106:11-17
40. Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolyso-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *Journal of biological chemistry*. 2009; 284:31493-31497.
41. Lotta LA, Garagiola I, Palla R, Cairo A, Peyvandi F. ADAMTS13 mutations in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Human Mutation* 2010; 31:11-19
42. Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikaya K. Structure of von Willebrand Factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276:41059-41063.
43. Nishio K, Anderson PJ, Zheng XL, Sadler JE. Binding of platelet glycoprotein Iba to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13. *PNAS* 2004; 101:10578-10583
44. Ai J, Smith P, Wang S, Zhang P, Zheng XL. The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor. *Biol Chem*. 2005; 280:29428-34.
45. Zheng X, Nishio K, Majerus EM, Sadler JE. Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. *J Biol Chem*. 2003; 278:30136-41.
46. Zhang P, Pan W, Rux AH, Sachais BS, Zheng XL. The cooperative activity between the carboxy-terminal TSP1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow. *Blood* 2007; 110:1887-1894.
47. Zanardelli S, Chion ACK, Groot E, Leting PJ, McKinnon TAJ, Laffan MA, Tseng M, Lane DA. A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood* 2009; 114:2819-2828.
48. Davis AK, Makar RS, Stowel CP, Kuter DJ, Dzik WH. ADAMTS13 binds to CD36: a potential mechanism for platelet and endothelial localization of ADAMTS13. *Transfusion* 2009; 49:206-213
49. Peyvandi F, Palla R, Lotta A, Mackie I, Scully A, Machin J. ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* . 2010; 8:631-640.
50. Loof AH, van Vliet HH, Kappers-Klunne MC. Low activity of von Willebrand factor-cleaving protease is not restricted to patients suffering from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2001; 112:1087-1088
51. Tsai HM. Is severe deficiency of ADAMTS13 specific for thrombotic thrombocytopenic purpura? Yes. *J Thromb Haemost*. 2003; 1:625-631

52. Vesely SK, George JN, Lämmle B, Studt JD, Alberio JD, El-Harake MA, Raskob GE. ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: relation to presenting features and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients. *Blood* 2003; 102:60-68
53. Manucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2001; 98:2730-2735
54. Kremer Hovinga JA, Zeerleder S, Kessler P, Romani de Wit T, van Mourik JA, Hack CE, Ten Cate H, Reitsma PH, Wuillemin WA, Lämmle B. ADAMTS13, von Willebrand factor and related parameters in severe sepsis and septic shock. *J Thromb Haemost* 2007; 5:2284-2290
55. Terrel DR, Williams LA, Vesely SK, Lämmle B, Hovinga AK. The incidence of thrombotic thrombocytopenic purpura- haemolytic uremic syndrome: all patients, idiopathic patients, and patients with severe ADAMTS13 deficiency. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1432-1436
56. Miller CH, Haff E, Platt SJ, Rawlins P, Drews CD, Dilley AB, Evatt B. Measurement of von Willebrand factor activity: relative effects of ABO blood type and race. *J Thromb Haemost* 2003; 1:2191-2197.
57. Scheiflinger F, Knobl P, Trattner B, Plaimauer B, Mohr G, Dockal M, Dorner F, Rieger M. Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2003; 102:3241-3243
58. Schulman I, Pierce M, Luckens A, Currimbhoy Z. Studies on Thrombopoiesis. I. A factor in normal human plasma required for platelet production; chronic thrombocytopenia due to its deficiency. *Blood*. 1960; 16:943-957
59. Upshaw JD Jr. Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med*. 1978; 298:1350-1352
60. Loirat C, Girma JP, Desconclois C, Coppo P, Veyradier A. Thrombotic thrombocytopenic purpura related to severe ADAMTS1 deficiency in children. *Pediatr Nephrol* 2009; 24:19-29
61. Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, yagi H, Ishizashi, Funato M, Tamai H, Konno M, Kamide K, Kawano Y, Miyata T, Fujimura Y. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:11902-11907
62. Plaimauer B, Fuhrmann J, Mohr G, Wernhart W, Bruno K, Ferrari S, Konestshy C, Antoine G, Rieger M, Scheiflinger F. Modulation of ADAMTS13 secretion and specific activity by a combination of common amino acid polymorphisms and missense mutation. *Blood* 2006; 107:118-125

63. Garagiola I, Valsecchi C, Lavoretano S, Oren H, Bohm M, Peyvandi F. Non sense mediated mRNA decay in the ADAMTS13 gene caused by a 29-nucleotide deletion. *Haematologica* 2008; 93:1678-1685
64. Antoine G, Zimmermann K, Plaimauer B, Grillowitz M, Studt JD, Lämmle B, Scheiflinger F. ADAMTS13 gene defects in two brothers with constitutional thrombotic thrombocytopenic purpura and normalization of von Willebrand factor-cleaving protease activity by recombinant human ADAMTS13. *Br J Haematol.* 2003; 120:821-4
65. Camilleri RS, Cohen H, Mackie IJ, Scully M, Starke RD, Crawley JT, Lane DA, Machin SJ Prevalence of the ADAMTS-13 missense mutation R1060W in late onset adult thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2008; 6:331-8.
66. Donadelli R, Banterla F, Galbusera M, Capoferri C, Bucchioni S, Gastoldi S, Nosari S, Monteferrante G, Ruggeri ZM, Bresin E, Scheiflinger F, Rossi E, Martinez C, Coppo R, Remuzzi G, Noris M; International Registry of Recurrent and Familial HUS/TTP. In-vitro and in-vivo consequences of mutations in the von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* 2006; 96:454-64
67. Schneppenheim R, Kremer Hovinga JA, Becker T, Budde U, Karpman D, Brockhaus W, Hrachovinová I, Korczowski B, Oyen F, Rittich S, von Rosen J, Tjønnfjord GE, Pimanda JE, Wienker TF, Lämmle B. A common origin of the 4143insA ADAMTS13 mutation. *Thromb Haemost.* 2006 Jul;96(1):3-6
68. Tao Z, Anthony K, Peng Y, Choi H, Nolasco L, Rice L, Moake JL, Dong JF. Novel ADAMTS-13 mutations in an adult with delayed onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2006; 4:1931-5.
69. Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, Isonishi A, Soejima K, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuranishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Wada H, Murata M, Ikeda Y, Miyata T, George JN. Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br J Haematol.* 2009;144: 742-54.
70. Shibagaki Y, Matsumoto M, Kokame K, Ohba S, Miyata T, Fujimura Y, Fujita T. Novel compound heterozygote mutations (H234Q/R1206X) of the ADAMTS13 gene in an adult patient with Upshaw-Schulman syndrome showing predominant episodes of repeated acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21:1289-92.
71. Veyradier A, Lavergne JM, Ribba AS, Obert B, Loirat C, Meyer D, Girma JP. Ten candidate ADAMTS13 mutations in six French families with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome). *J Thromb Haemost.* 2004; 2:424-9.
72. Hommais A, Rayes J, Houllier A, Obert B, Legendre P, Veyradier A, Girma JP, Ribba AS. Molecular characterization of four ADAMTS13 mutations responsible for congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome). *Thromb Haemost.* 2007; 98:593-9.

73. Matsumoto M, Kokame K, Soejima K, Miura M, Hayashi S, Fujii Y, Iwai A, Ito E, Tsuji Y, Takeda-Shitaka M, Iwadate M, Umeyama H, Yagi H, Ishizashi H, Banno F, Nakagaki T, Miyata T, Fujimura Y. Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood*. 2004; 103:1305-10.
74. Pimanda JE, Maekawa A, Wind T, Paxton J, Chesterman CN, Hogg PJ. Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura in association with a mutation in the second CUB domain of ADAMTS13. *Blood*. 2004;103: 627-9.
75. Assink K, Schiphorst R, Allford S, Karpman D, Etzioni A, Brichard B, van de Kar N, Monnens L, van den Heuvel L. Mutation analysis and clinical implications of von Willebrand factor-cleaving protease deficiency. *Kidney Int*. 2003; 63:1995-9.
76. Kokame K, Aoyama Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. Inherited and de novo mutations of ADAMTS13 in a patient with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost*. 2008; 6:213-5.
77. Licht C, Stapenhorst L, Simon T, Budde U, Schneppenheim R, Hoppe B. Two novel ADAMTS13 gene mutations in thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic-uremic syndrome (TTP/HUS). *Kidney Int*. 2004; 66:955-8.
78. Meyer SC, Jeddi R, Meddeb B, Gouider E, Lämmle B, Kremer Hovinga JA. A first case of congenital TTP on the African continent due to a new homozygous mutation in the catalytic domain of ADAMTS13. *Ann Hematol*. 2008; 87:663-6.
79. Palla R, Lavoretano S, Lombardi R, Garagiola I, Karimi M, Afrasiabi A, Ramzi M, De Cristofaro R, Peyvandi F. The first deletion mutation in the TSP1-6 repeat domain of ADAMTS13 in a family with inherited thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2009; 94:289-93
80. Savasan S, Lee SK, Ginsburg D, Tsai HM. ADAMTS13 gene mutation in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with previously reported normal VWF cleaving protease activity. *Blood*. 2003 ; 101:4449-51.
81. Schneppenheim R, Budde U, Oyen F, Angerhaus D, Aumann V, Drewke E, Hassenpflug W, Häberle J, Kentouche K, Kohne E, Kurnik K, Mueller-Wiefel D, Obser T, Santer R, Sykora KW. von Willebrand factor cleaving protease and ADAMTS13 mutations in childhood TTP. *Blood*. 2003; 101:1845-50.
82. Studt JD, Kremer Hovinga JA, Antoine G, Hermann M, Rieger M, Scheifflinger F, Lämmle B. Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by haemoglobin. 2005; 105: 542-544.
83. Uchida T, Wada H, Mizutani M, Iwashita M, Ishihara H, Shibano T, Suzuki M, Matsubara Y, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikeda Y, Murata M; Research Project on Genetics of Thrombosis. Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2004; 104:2081-3.

84. Fakhouri F, Vernant JP, Veyradier A, Xolf M, Kaplanski G, Binaut R, Rieger M, Scheifflinger F, Poullin P, Deroure B, Delarue R, Lesavre P, Vnhille P, Hermine O, Remuzzi G, Grünfeld JP. Efficiency of curative and prophylactic treatment with rituximab in ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura: a study of 11 cases. *Blood* 2005; 106:1932-1937
85. Moatti Marie. Microangiopathies thrombotiques et grossesse. Thèse d'exercice pour l'obtention du diplôme d'état de pharmacien. Université Paris 5, 2010, 65p.
86. Feys HB, Canciani MT, Peyvandi F, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K, Mannucci PM. ADAMTS13 activity to antigen ratio in physiological and pathological conditions associated with an increased risk of thrombosis. *Br J Haematol.* 2007; 138:534-40
87. Sánchez-Luceros A, Farías CE, Amaral MM, Kempfer AC, Votta R, Marchese C, Salviú MJ, Woods AI, Meschengieser SS, Lazzari MA. von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb Haemost.* 2004; 92:1320-6.
88. Castanet M, Mallya U, Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Demuth S, Raymond FL, Schwabe J, Gurnell M, Chatterjee VK. Maternal isodisomy for chromosome 9 causing homozygosity for a novel FOXE1 mutation in syndromic congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95:4031-6.
89. van Riesen AK, Antonicka H, Ohlenbusch A, Shoubridge EA, Wilichowski EK. Maternal segmental disomy in Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency caused by homozygous SURF1 mutation. *Neuropediatrics.* 2006 ; 37:88-94.
90. Sulisalo T, Mäkitie O, Sistonen P, Ridanpää M, el-Rifai W, Ruuskanen O, de la Chapelle A, Kaitila I. Uniparental disomy in cartilage-hair hypoplasia. *Eur J Hum Genet.* 1997; 5:35-42.
91. Fukami M, Kato F, Tajima T, Yokoya S, Ogata T. Transactivation function of an approximately 800-bp evolutionarily conserved sequence at the SHOX 3' region: implication for the downstream enhancer. *Am J Hum Genet.* 2006; 78:167-70

Nom : GARREC

Prénom : Céline

Titre du Mémoire/Thèse : Recherche de mutations du gène ADAMTS13 dans deux cohortes de patients suspects de syndrome d'Upshaw-Schulman

Résumé du Mémoire/Thèse :

Le syndrome d'Upshaw-Schulman ou purpura thrombotique thrombocytopénique héréditaire (PTT) est une pathologie génétique autosomique récessive rare, engageant le pronostic vital, dont le mécanisme physiopathologique réside dans l'altération constitutionnelle de la protéase du facteur de von Willebrand, ADAMTS13 (*a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeats*). Des mutations hétérozygotes composites ou homozygotes du gène ADAMTS13 ont été impliquées dans la survenue de la maladie. Ce mémoire expose les résultats du séquençage des régions codantes du gène ADAMTS13 chez 35 patients suspects de syndrome d'Upshaw-Schulman, répartis en deux cohortes distinctes, qui diffèrent par l'âge du début de la pathologie. Nous avons mis en évidence 25 mutations non décrites dans la littérature internationale, et souligné les effets fonctionnels fins de certains modulateurs de l'activité ADAMTS13.

Mots-clé : syndrome d'Upshaw-Schulman, purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT), gène ADAMTS13, séquençage