



**HAL**  
open science

# Protéolyse du facteur Willebrand et cardiopathies à forces de cisaillement élevées : nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques

Antoine Rauch

► **To cite this version:**

Antoine Rauch. Protéolyse du facteur Willebrand et cardiopathies à forces de cisaillement élevées : nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S052 . tel-01249607

**HAL Id: tel-01249607**

**<https://theses.hal.science/tel-01249607>**

Submitted on 4 Jan 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

**Ecole doctorale 446 Biologie-Santé**

Option recherche clinique, innovation technologique, santé publique

**PROTEOLYSE DU FACTEUR WILLEBRAND ET CARDIOPATHIES A FORCES  
DE CISAILLEMENT ELEVEES :**

**NOUVELLES APPROCHES DIAGNOSTIQUES ET THERAPEUTIQUES**

Thèse dirigée par le Professeur Sophie Susen et le Dr Peter Lenting

Présentée et soutenue publiquement par

**Antoine Rauch**

le 19 Décembre 2014

JURY

Monsieur le Professeur Jean François SCHVED	Président du jury
Monsieur le Professeur David SMADJA	Rapporteur
Monsieur le Professeur Jean Philippe COLLET	Rapporteur
Madame le Professeur Nadine AJZENBERG	Examineur
Monsieur le Docteur Peter LENTING	Co-Directeur de thèse
Madame le Professeur Sophie SUSEN	Directrice de thèse

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

**Ecole doctorale 446 Biologie-Santé**

Option recherche clinique, innovation technologique, santé publique

**PROTEOLYSE DU FACTEUR WILLEBRAND ET CARDIOPATHIES A FORCES  
DE CISAILLEMENT ELEVEES :**

**NOUVELLES APPROCHES DIAGNOSTIQUES ET THERAPEUTIQUES**

Thèse dirigée par le Professeur Sophie Susen et le Dr Peter Lenting

Présentée et soutenue publiquement par

**Antoine Rauch**

le 19 Décembre 2014

JURY

Monsieur le Professeur Jean François SCHVED	Président du jury
Monsieur le Professeur David SMADJA	Rapporteur
Monsieur le Professeur Jean Philippe COLLET	Rapporteur
Madame le Professeur Nadine AJZENBERG	Examineur
Monsieur le Docteur Peter LENTING	Co-Directeur de thèse
Madame le Professeur Sophie SUSEN	Directrice de thèse

## REMERCIEMENTS

J'adresse mes plus sincères remerciements à Madame Sophie Susen et Monsieur Peter Lenting pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et la qualité de leur encadrement.

Je remercie Monsieur David Smadja et Monsieur Jean-Philippe Collet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail ainsi que Madame Nadine Ajzenberg et Monsieur Jean François Schved qui me font l'honneur d'évaluer ma thèse.

Je remercie Mesdames Brigitte Jude et Cécile Denis de m'avoir accueilli au sein de leurs équipes et ceci dans les meilleures conditions.

Je remercie Madame Jenny Goudemand pour la confiance qu'elle m'a témoignée pour concilier ces 3 dernières années ce travail de thèse et l'activité du service.

Je n'oublie pas Mr Eric Van Belle et les longues séances consacrées à l'écriture d'article.

Un grand merci à toutes les personnes que j'ai cotoyées ces 3 années au sein de l'EA2693 et de l'U770. Je tiens notamment à exprimer ma profonde reconnaissance et mon respect envers Mme Paulette Legendre dont j'ai pu apprécier les compétences et la disponibilité lors de mes séjours dans l'U770. Je remercie également Mme Sylvie Hermoire, Mme Florence Vaast et Mr Alexandre Ung pour leur aide et leur soutien.

A Elsa, ma femme, pour son soutien et sa patience au cours de ces trois années.

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	9
I. Facteur von Willebrand et ADAMTS13.....	10
1. Le facteur Willebrand (VWF).....	10
a. Biosynthèse et structure primaire.....	10
b. Sécrétion et clairance plasmatique.....	16
c. Fonctions du VWF.....	18
2. L'ADAMTS13.....	24
a. Biosynthèse et structure primaire.....	24
b. Sécrétion et clairance.....	25
c. Fonction de l'ADAMTS13 : la protéolyse du VWF.....	25
II. La maladie de Willebrand (VWD).....	32
1. Définition et prévalence.....	32
a. VWD constitutionnelle.....	32
b. VWD acquise.....	33
2. Physiopathologie de la VWD.....	33
a. Classification et bases moléculaires de la VWD constitutionnelle.....	33
b. Physiopathologie de la VWD acquise.....	39
3. Manifestations cliniques.....	40
4. Diagnostic biologique.....	42
5. Traitement.....	44

III.	VWD acquise au cours des cardiopathies à forces de cisaillement élevées.....	46
1.	VWD acquise et rétrécissement aortique .....	46
2.	VWD acquise et assistances circulatoires mécaniques à flux continu .....	48
a.	Historique et indications des assistances circulatoires mécaniques (ACM).....	48
b.	Manifestations hémorragiques sous ACM à flux continu .....	53
c.	Syndrome de Willebrand acquis et ACM à flux continu.....	54
3.	Diagnostic.....	56
4.	Traitement .....	56
a.	Traitement et prévention des épisodes hémorragiques.....	56
b.	Traitement de la cardiopathie causale .....	57
	OBJECTIFS DU TRAVAIL .....	60

CHAPITRE 1 : Le facteur von Willebrand comme biomarqueur d'anomalies de flux dans les cardiopathies à forces de cisaillements élevées..... 64

**Publication 1 : Von Willebrand factor as a biological sensor of blood flow in heart disease and interventions.** Van Belle E\*, Rauch A\*, Vincentelli A, Jeanpierre E, Legendre P, Juthier F, Banfi C, Rousse N, Godier A, Caron C, Elkalioubie A, Corseaux D, Dupont A, Zawadzki C, Mouquet F, Chinetti G, Staels B, Goudemand J, Jude B, Lenting PJ, Susen S. (\*Co-auteurs). En révision.

CHAPITRE 2 : Prévention de la dégradation du VWF sous assistance circulatoire mécanique à flux continu..... 104

**Publication 2: Antibody-based prevention of von Willebrand factor degradation mediated by circulatory assist devices.**

Rauch A, Legendre P, Christophe OD, Goudemand J, van Belle E, Vincentelli A, Denis CV, Susen S, Lenting PJ. *Thromb Haemost.* 2014 Jul 17;112(5). (Epub ahead of print)

CHAPITRE 3 : Développement et évaluation d'un nouveau test ELISA pour le diagnostic des formes de maladie de Willebrand associées à un excès de protéolyse du VWF..... 141

**Article non soumis: ELISA-based diagnosis of VWF disorders associated to increased VWF proteolysis**

DISCUSSION GENERALE .....	162
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	174
ANNEXES .....	177
<b><u>Revue 1: On the versatility of von Willebrand factor</u></b> .....	178
<u>Antoine Rauch</u> , Nikolett Wohner, Olivier D. Christophe, Cécile V. Denis, Sophie Susen, Peter J. Lenting. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2013 Jul 10;5(1):e2013046	
<b><u>Revue 2: Facteur von Willebrand et maladie de Willebrand : actualités</u></b> .....	213
<u>Antoine Rauch</u> , Claudine Caron, Sophie Susen, Jenny Goudemand. Revue Francophone des Laboratoires, Vol 2014 - N° 463 - juin 2014.	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	245

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1: Structure primaire multi-domaines du pré-pro-VWF .....	11
Figure 2: Représentation schématique de la biosynthèse du VWF dans la cellule endothéliale .....	12
Figure 3: Changement de conformation du domaine A2 en présence de forces de cisaillement élevées .....	14
Figure 4: Localisation des sites d'interaction du VWF avec ses principaux ligands .....	15
Figure 5: changement conformationnel du VWF en présence de forces de cisaillement d'intensité croissante .....	18
Figure 6: Structure primaire multi-domaines de la pro-ADAMTS13 .....	24
Figure 7: Représentation schématique de l'interaction multi-sites VWF-ADAMTS13 .....	26
Figure 8: Régulation de la taille du VWF par l'ADAMTS13.....	29
Figure 9: Présence anormale de multimères de très haut poids moléculaire dans le sang en l'absence d'ADAMTS13 fonctionnelle .....	30
Figure 10: Localisation des anomalies de traduction en fonction du type de maladie de Willebrand ..	35
Figure 11: Place de la détermination du profil multimérique du VWF dans la stratégie de diagnostic et de typage de la maladie de Willebrand.....	43
Figure 12: Physiopathologie de la dégradation des multimères de haut poids moléculaire du VWF en présence d'un rétrécissement aortique sévère .....	47
Figure 13: Assistance ventriculaire gauche par pompe rotative à flux continu HeartMateII .....	49
Figure 14: ECMO veino-artérielle périphérique fémoro-fémorale. ....	49
Figure 15: Procédures de cardiologie interventionnelle TAVI et BAV indiquées dans le traitement du Rao. ....	58
Figure 16 : Persistance d'un déficit en VWF-HPM post-TAVI : hypothèse de la régurgitation para-valvulaire .....	164
Table 1: Classification ISTH de la VWD constitutionnelle .....	34
Table 2: Ancienne classification phénotypique de la VWD constitutionnelle de type 2A.....	38
Table 3: Classification des ACM de longue durée.....	50
Table 4: ACM de courte durée.....	51
Table 5: ACM par cœurs artificiels .....	51



## LISTE DES ABREVIATIONS

Aa : Acide aminé

ACM : assistance circulatoire mécanique

ACM-FC : assistance circulatoire mécanique à flux continu

ADAMTS13 : A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin domains-

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADP : adénosine diphosphate

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ASGPR : asialoglycoprotein receptor

AVWS : syndrome de Willebrand acquis

BAV : Balloon Aortic Valvuloplasty

BHK : Baby Hamsters Kidney

BLI : biolayer interferometry

CEC : circulation extra-corporelle

CLEC4M : C-type lectin domain family 4 member M

ECMO : oxygénation par membrane extra-corporelle

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

FVIII : facteur VIII

GpIb $\alpha$  : glycoprotéine plaquettaire Ib $\alpha$

HM-II® : assistance circulatoire mécanique à flux continu HeartMate-II®

I/R : ischémie-reperfusion

ISTH : International Society of Thrombosis and Haemostasis

Kb : Kilobases

KDa : Kilodaltons

LRP-1: Low density lipoprotein receptor-related protein 1

M : résidu Méthionine

NETs : neutrophil extracellular traps

PTT : purpura thrombotique thrombocytopénique

Rao : rétrécissement aortique

RE : réticulum endoplasmique

RVAo : remplacement valvulaire aortique

SDS : sodium dodécyl sulfate

Siglec-5 : Sialic acid-binding Ig-like lectin 5

TAVI : Transcatheter Aortic Valve Implantation

TVP : thrombose veineuse profonde

VEGF-R2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2

VWD : maladie de Willebrand

VWF : facteur von Willebrand

VWF:Ag : dosage antigénique du facteur von Willebrand

VWF:Rco : activité cofacteur de la ristocétine du facteur von Willebrand

VWF:CB : test de liaison du facteur von Willebrand au collagène

VWF-BPM : multimères de bas poids moléculaire du facteur von Willebrand

VWF-IPM : multimères de poids moléculaire intermédiaire du facteur von Willebrand

VWF-HPM : multimères de haut poids moléculaire du facteur von Willebrand

VWF-THPM : multimères de très haut poids moléculaire

Y : résidu Tyrosine

## **INTRODUCTION GENERALE**

## I. Facteur von Willebrand et ADAMTS13

### 1. Le facteur Willebrand (VWF)

#### a. Biosynthèse et structure primaire

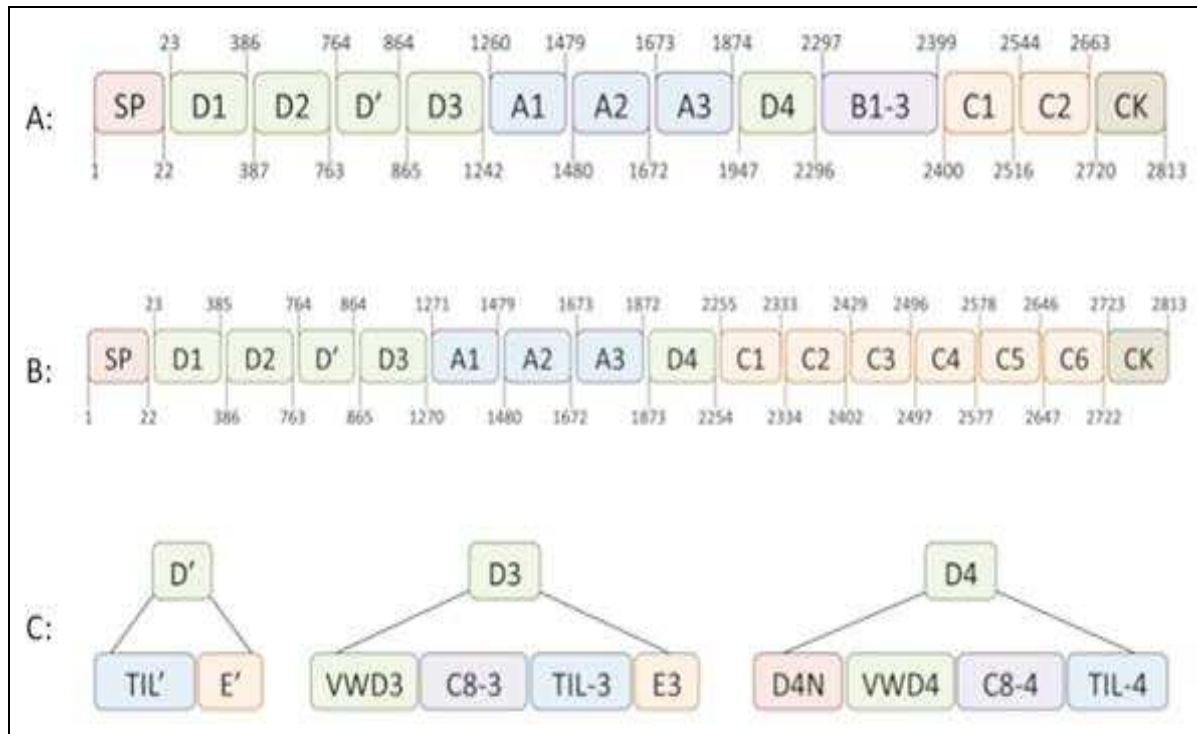
Le facteur Willebrand (von Willebrand factor, abrégé VWF dans la nomenclature internationale) est une glycoprotéine multimérique synthétisée par les cellules endothéliales <sup>[1]</sup> et les mégacaryocytes <sup>[2]</sup>, précurseurs des plaquettes. La protéine a été isolée en 1973 <sup>[3]</sup> puis le gène *VWF* a été cloné et séquencé par 4 équipes indépendantes en 1985 <sup>[4] [5] [6] [7]</sup>. Ce gène très polymorphe de 178 kilobases (kb), situé sur le bras court du chromosome 12 (12p13.3,) est constitué de 52 exons. Il code pour un ARN messager (ARNm) de 9 kb, qui est traduit en un précurseur polypeptidique monomérique de 2 813 acides aminés (aa) : le pré-pro-VWF. On individualise sur ce précurseur le peptide signal de 22 aa (exons 2-3), le propeptide de 741 aa (exons 3-18) et la sous-unité mature de 2050 aa (exons 19-52) (**Figure 1**). On distingue également sur le bras long du chromosome 22 un pseudo-gène non fonctionnel (*VWFP*), qui correspond aux exons 23 à 34 du gène *VWF*, avec lequel il existe une forte homologie de séquence aux alentours de 97% <sup>[8]</sup>.

#### *Structure primaire*

La structure primaire du VWF se caractérise par une organisation multi-domaines, avec à partir de l'extrémité N-terminale, la succession de 5 types de domaines homologues (A, B, C, D et CK) <sup>[9]</sup>. La structure primaire du pré-pro-VWF était ainsi classiquement représentée selon la séquence D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK (**Figure 1A**). Cette séquence a été récemment révisée après une étude du VWF par microscopie électronique : D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK (**Figure 1B**). Cette technique a permis une étude plus approfondie de l'organisation multi-domaines du VWF. Elle a ainsi mis

en évidence : 1) la présence de 6 domaines C consécutifs au lieu des 2 précédemment décrits, dans la région distale du VWF entre le domaine D4 et l'extrémité C-terminale (le site d'interaction avec l'intégrine  $\alpha 2\beta 3$  étant désormais localisé dans le domaine C4) (**Figure 1B**)

2) un deuxième niveau d'organisation structurale concernant les domaines D qui s'avèrent constitué d'une succession de domaines indépendants (**Figure 1C**)<sup>[10]</sup>.

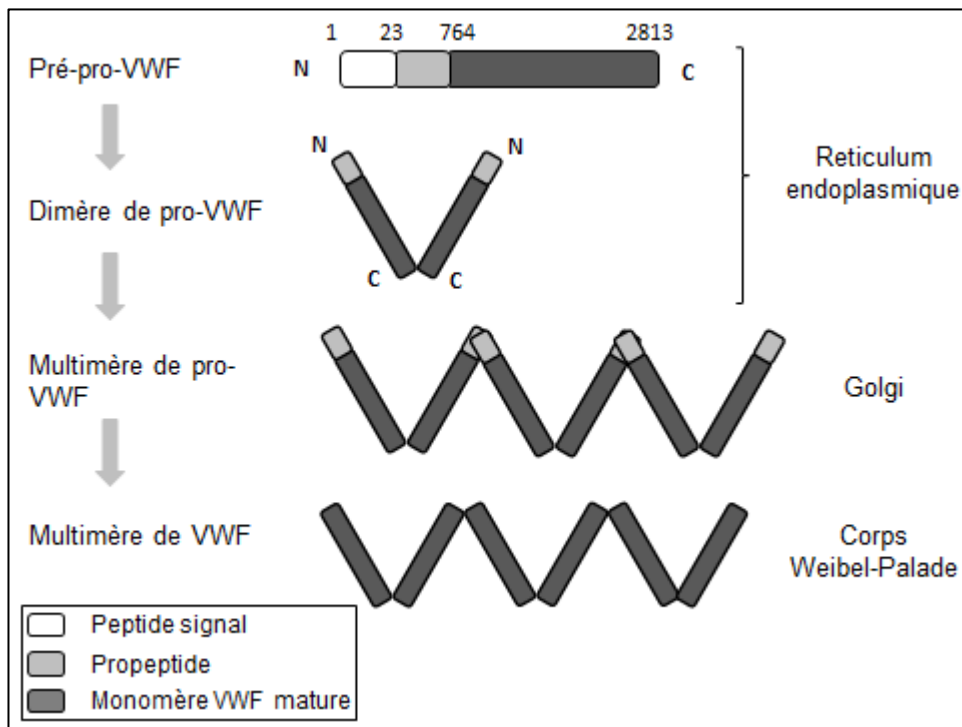


**Figure 1: Structure primaire multi-domaines du pré-pro-VWF** (d'après Zhou et al)

Le VWF est constitué d'une succession de domaines homologues. Cinq domaines distincts (A, B, C, D et CK) figuraient dans l'ancienne représentation (Fig 2A). Cette dernière a été révisée récemment. Les domaines B1-3, C1 et C2 sont désormais remplacés par six domaines C homologues (Fig 2B). L'analyse en microscopie électronique des domaines D a permis d'identifier un 2<sup>e</sup> niveau d'organisation structurale. Les domaines D1, D2 et D3 sont constitués de 4 structures indépendantes : un domaine von-Willebrand (VW), une structure cystéine-8 (C8), une structure trypsin-inhibitor-like (TIL) et un module E. Il n'existe pas de domaine WD ou de structure TIL sur le domaine D'. Le domaine D4 n'a pas de module E mais comprend une séquence spécifique D4N (d'après Zhou et al, Blood 2012).

### Dimérisation et multimérisation

Le pré-pro-VWF subit de nombreuses modifications post-traductionnelles (**Figure 2**). Après clivage du peptide signal (aa 1 à 22 de la partie N-terminale du VWF) par une furine lors de la translocation du pré-pro-VWF dans le réticulum endoplasmique (RE), les monomères de pro-VWF subissent une N-glycosylation et s'assemblent au niveau du RE (pH~7.4) en dimères de pro-VWF via la formation de ponts disulfures inter-chaînes entre les extrémités C-terminales (domaines CK) <sup>[11]</sup>. Le processus de maturation se poursuit ensuite dans l'appareil de Golgi où les dimères de pro-VWF sont le siège d'une O-glycosylation, d'une sulfatation et s'assemblent en multimères. Cette multimérisation repose sur la formation de ponts disulfures entre les extrémités N-terminales (domaine D3) des dimères de pro-VWF <sup>[12]</sup>. Le propeptide, via son activité disulfide isomérase, est essentiel à cette étape de multimérisation <sup>[13]</sup>.



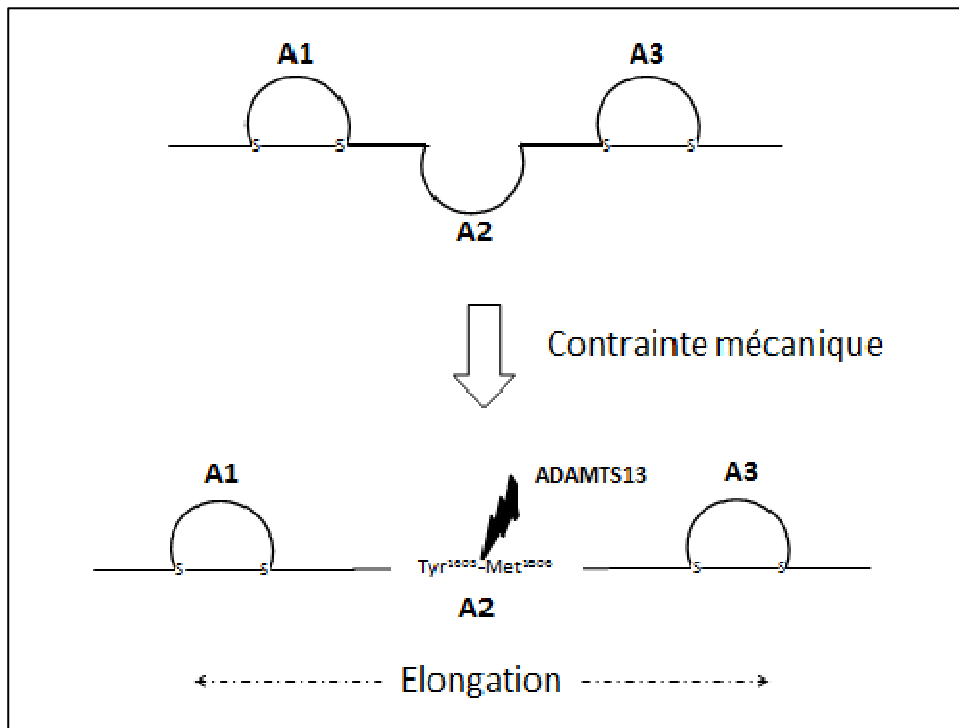
**Figure 2: Représentation schématique de la biosynthèse du VWF dans la cellule endothéliale**

Le changement des conditions de pH dans le Golgi (pH~6.2) a par ailleurs un retentissement important sur la conformation des dimères de pro-VWF. Ce pH acide favorise l'association homolatérale des domaines D1D2 côté N-terminal, et des domaines A2, A3, D4 et des 6 domaines C situés entre les domaines D4 et CK côté N-terminal. Les dimères de pro-VWF adoptent ainsi une conformation dite de « dimères en bouquet » qui favorise la compaction hélicoïdale des multimères de VWF formés au niveau du Golgi <sup>[14] [15] [16]</sup>. Ce changement de conformation pH-dépendant des dimères de pro-VWF permet l'enroulement hélicoïdal des multimères néformés au niveau du Golgi. Ceci entraîne une compaction du VWF, essentielle à son stockage dans des organelles intra-cellulaires : corps de Weibel-Palade endothéliaux ou granules  $\alpha$  plaquettaires. Le clivage du propeptide (aa 23 à 763) par une furine au niveau du réseau trans-golgien marque la fin du processus de multimérisation. Le VWF est alors soit libéré directement dans le plasma et le sous-endothélium, soit stocké dans les corps de Weibel-Palade endothéliaux ou les granules  $\alpha$  plaquettaires. Dans ces organelles, la sous-unité mature du VWF et le propeptide sont liés de façon non-covalente, selon un rapport iso-stoichiométrique.

### *Ponts disulfures*

Le VWF est une protéine riche en cystéines avec un total de 232 résidus sur les 2813 que comporte la sous-unité mature <sup>[17]</sup>. Leur distribution est hétérogène car ils sont majoritairement localisés aux extrémités N- et C-terminales du VWF. Ils sont tous impliqués dans la formation de liaisons disulfures intra- et inter-chaînes. Ces résidus cystéines ont un rôle important dans la structure secondaire du VWF et certains d'entre eux sont nécessaires à la dimérisation (domaine CK) et la multimérisation (domaine D3) du VWF <sup>[18]</sup>. A l'inverse, les domaines A1, A2 et A3 ne comportent que deux résidus cystéines chacun. Ces résidus sont à l'origine de la structure en boucle des domaines A1 (entre cystéines 1272 et 1458) et A3

(entre cystéines 1686 et 1872) alors que le domaine A2, où les cystéines sont en position adjacente (1669-1670), en est dépourvu. Cette particularité structurale du domaine A2 lui confère une grande sensibilité à l'élongation en présence de forces de cisaillement élevées (**Figure 3**).



**Figure 3: Changement de conformation du domaine A2 en présence de forces de cisaillement élevées**

Représentation schématique de l'élongation du domaine A2 du VWF en présence de forces de cisaillement élevées ou après liaison du VWF à la P-sélectine, au collagène ou à la GpIba plaquettaire. Ce changement de conformation local favorise l'exposition du site de protéolyse Y<sup>1605</sup>-M<sup>1606</sup> à l'ADAMTS13.

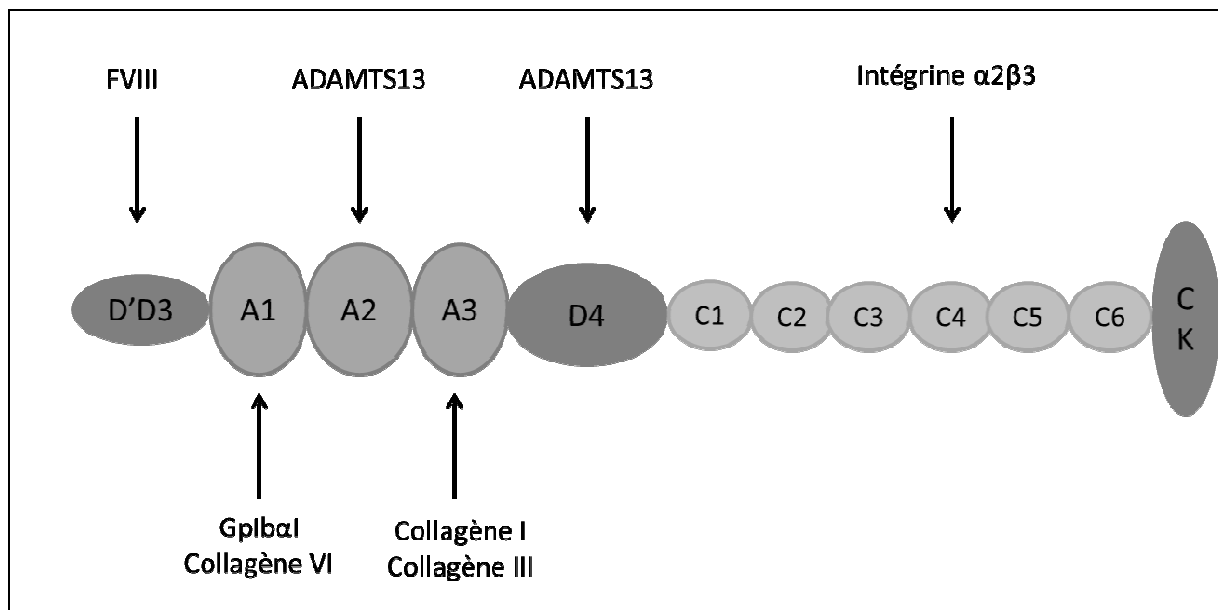
### *Glycosylation*

Le VWF est une protéine riche en oligosaccharides qui représentent environ 20% du poids total de la molécule. Au niveau de chaque sous-unité mature, il existe 12 sites de N-glycosylations (sur des résidus asparagine) et 10 sites de O-glycosylations (sur des résidus



sérine ou thréonine). La composition oligosaccharidique du VWF diffère selon que le VWF soit d'origine endothéliale ou plaquettaire. Le VWF plaquettaire est ainsi moins sialylé et n'exprime pas les déterminants antigéniques de groupe sanguin A et B [19].

On distingue au niveau de la structure primaire du VWF les principaux sites d'interaction pour les ligands du VWF : le facteur VIII (domaines D' et D3), la glycoprotéine plaquettaire GpIb $\alpha$  (domaine A1), le collagène sous-endothélial (domaines A1 et A3) et l'intégrine plaquettaire  $\alpha$ 2b $\beta$ 3 (domaine C4) (**Figure 4**). Ces sites sont directement accessibles à leurs ligands, à l'exception de celui impliqué dans la liaison à la GpIb $\alpha$  (domaine A1) et du site de protéolyse de l'ADAMTS13 Y<sup>1605</sup>-M<sup>1606</sup> (domaine A2), qui nécessitent au préalable l'élongation du VWF. Ceci prévient respectivement la liaison spontanée du VWF aux plaquettes circulantes et la dégradation spontanée du VWF par l'ADAMTS13 dans le plasma.



**Figure 4: Localisation des sites d'interaction du VWF avec ses principaux ligands** (impliqués dans l'adhésion plaquettaire, l'agrégation plaquettaire et le transport du FVIII).

## **b. Sécrétion et clairance plasmatique**

### *Sécrétion*

Les cellules endothéliales constituent la principale source de VWF plasmatique. Le VWF endothélial, stocké dans les corps de Weibel-Palade, est libéré du côté apical de la cellule dans le plasma et du côté basal dans le sous-endothélium vasculaire selon 2 voies distinctes. La voie constitutive permet une libération continue de VWF vers le plasma et le sous-endothélium. La voie régulée permet la sécrétion du VWF à partir des corps de Weibel-Palade, sous l'influence de stimuli variés et nombreux : thrombine, adrénaline, vasopressine, hypoxie ou forces de cisaillement <sup>[20]</sup>. L'effet agoniste de la vasopressine sur la sécrétion endothéliale du VWF est exploité cliniquement pour le traitement de certaines formes modérées de maladie de Willebrand (VWD) via l'utilisation d'un analogue synthétique de la vasopressine : la desmopressine (1-deamino-8-D-arginine vasopressine : DDAVP) <sup>[21]</sup>. Les plaquettes constituent la deuxième source de VWF plasmatique mais celle-ci est quantitativement accessoire. La sécrétion plaquettaire de VWF se fait à partir des granules  $\alpha$ , après activation plaquettaire par des agonistes comme la thrombine ou l'adénosine diphosphate (ADP).

### *Clairance du VWF*

La clairance du VWF plasmatique s'effectue au niveau du foie et de la rate <sup>[22]</sup> selon une cinétique indépendante de la taille des multimères <sup>[23]</sup>.

Les macrophages, les cellules endothéliales et les hépatocytes semblent contribuer à la clairance du VWF via l'expression de récepteurs membranaires dont la capacité à fixer le VWF varie selon le profil de glycosylation de ce dernier. Le récepteur ASPGR (Asialoglycoprotein receptor) exprimé à la surface des macrophages et des hépatocytes,

interviendrait ainsi essentiellement dans la clairance du VWF lorsque ce dernier est sous une forme hyposialylée, par exemple secondairement à l'action de sialidases bactériennes <sup>[24]</sup>. A l'exception du sepsis, cette voie de clairance joue probablement un rôle accessoire dans la clairance du VWF circulant, dont les structures glycaniques sont caractérisées par un degré important de sialylation terminale. D'autres récepteurs semblent en effet impliqués dans la clairance du VWF sialylé <sup>[22]</sup>: le récepteur macrophagique Siglec-5 (Sialic acid-binding Ig-like lectin 5) <sup>[25]</sup>, le récepteur endothélial CLEC4M (C-type lectin domain family 4 member M) <sup>[26]</sup> et le récepteur LRP-1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1) d'expression plus ubiquitaire. De façon notable, l'interaction entre VWF et LRP-1 n'intervient pas en conditions statiques et nécessite la présence d'une intensité minimale de forces de cisaillement <sup>[27]</sup>.

Le profil de glycosylation du VWF module également l'intensité du processus de clairance. On observe en effet des taux de VWF plasmatique significativement plus bas chez les sujets de groupe O versus non O en lien avec une clairance plus rapide du VWF. Les mécanismes sous-jacents à ce différentiel de clairance restent à déterminer.

A l'équilibre, la concentration plasmatique du VWF est de l'ordre de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  avec une demi-vie d'environ 12 heures. Les multimères présents dans le plasma peuvent contenir jusqu'à 30 sous-unités dimériques <sup>[14]</sup>. Le VWF constitue ainsi chez l'homme la plus grande protéine en circulation dans le plasma <sup>[28]</sup> avec une taille pouvant atteindre jusqu'à  $15 \mu\text{m}$  sous sa conformation étendue en présence de forces de cisaillement élevées <sup>[29]</sup>.

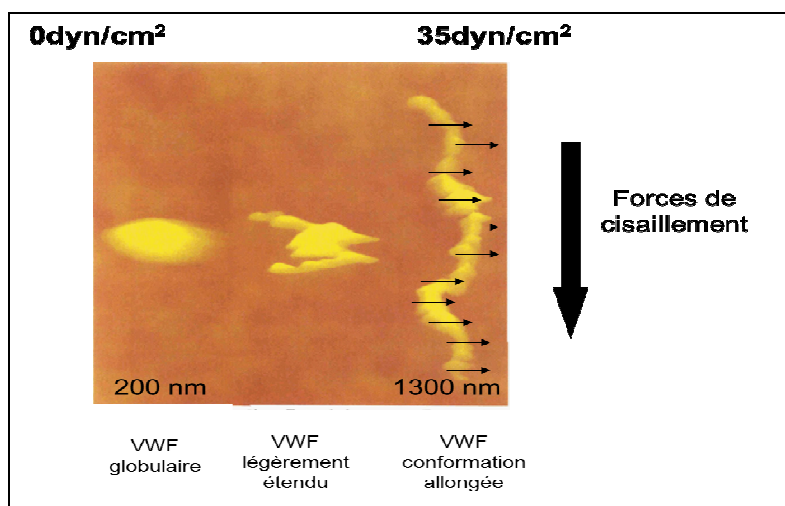
### c. Fonctions du VWF

#### i. Rôle pro-hémostatique

##### Adhésion et agrégation plaquettaire

En cas de brèche vasculaire, le VWF joue un rôle majeur dans le recrutement plaquettaire nécessaire à la formation du thrombus. Il intervient en effet dans l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium vasculaire puis l'agrégation plaquettaire, deux étapes essentielles à la formation du thrombus plaquettaire. Son rôle est particulièrement important dans la microcirculation, où les interactions entre le collagène sous-endothélial et les récepteurs plaquettaires GPVI ou  $\alpha 2\beta 1$  ne résistent pas à la présence de forces de cisaillement élevées. En présence de telles conditions rhéologiques, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire à la paroi vasculaire lésée sont alors essentiellement sous la dépendance du VWF <sup>[30]</sup>.

La séquence conduisant à la formation du thrombus plaquettaire en cas de brèche vasculaire est la suivante. Le VWF sous-endothélial et le VWF plasmatique liés au collagène sous endothélial subissent l'action de forces de cisaillement élevées qui induisent un changement de conformation (d'une conformation globulaire à une conformation étendue) (**Figure 5**).



**Figure 5: changement conformationnel du VWF en présence de forces de cisaillement d'intensité croissante** (observation du VWF par microscopie à force atomique d'après Siedlecki et al, 1996).

Ceci permet l'exposition sur les multimères des sites de liaison à la GpIb $\alpha$  plaquettaire au niveau des domaines A1. Les multimères de VWF constituent alors une surface adhésive pour les plaquettes circulantes permettant leur rolling puis leur adhésion réversible au sous-endothélium. Parallèlement, l'engagement du récepteur GpIb $\alpha$  induit une signalisation intra-plaquettaire qui permet l'activation plaquettaire (signalisation « outside-in »). Cette activation plaquettaire est nécessaire à l'expression membranaire de l'intégrine  $\alpha$ 2b $\beta$ 3 sous une conformation active (signalisation « inside-out »), liant la séquence RGD localisée dans les domaines C4 des multimères de VWF. L'interaction VWF-intégrine  $\alpha$ 2b $\beta$ 3 permet ainsi l'adhésion irréversible des plaquettes au sous-endothélium puis leur agrégation, étapes indispensables à la consolidation du thrombus plaquettaire. La fonction pro-adhésive du VWF est corrélée à sa taille. Les multimères plasmatiques de plus grande taille sont en effet les plus susceptibles d'activer les plaquettes en raison de leur importante avidité (nombre de sites de liaison pour la GpIb $\alpha$ ) et affinité intrinsèque (seuil d'élongation en présence de forces de cisaillement inversement corrélé à la taille des multimères) pour les plaquettes <sup>[14]</sup>.

#### Transport et stabilisation du facteur anti-hémophilique A (facteur VIII)

Le VWF plasmatique joue un rôle de protéine chaperonne vis-à-vis de nombreuses protéines <sup>[31]</sup>. Cette fonction de « bus moléculaire » s'exerce notamment vis-à-vis du facteur VIII (FVIII). Le VWF joue ainsi un rôle indirect dans la coagulation plasmatique en se liant au FVIII. La liaison non-covalente du VWF au FVIII repose sur un site de liaison spécifique localisé au niveau des domaines D'D3 (résidus 764-1035) <sup>[32,33]</sup>. Le FVIII lié au VWF ne peut interagir avec les constituants du complexe ténase (facteur IX, facteur X et phospholipides anioniques membranaires) ce qui prévient l'activation prématurée de la coagulation. La thrombine est en effet nécessaire au clivage du complexe FVIII-VWF et à l'activation du FVIII en FVIIIa. Cette interaction VWF-FVIII protège également le FVIII d'une dégradation

enzymatique prématurée par la protéine C activée <sup>[34]</sup>. En l'absence de formation du complexe VWF-FVIII, la demi-vie plasmatique du FVIII est ainsi réduite jusqu'à 1 à 2 heures au lieu de 12 heures en présence de VWF. Un déficit en FVIII peut donc être observé soit en cas de déficit quantitatif en VWF, soit en présence d'une mutation au sein des domaines D' et D3 affectant la capacité de liaison du VWF au FVIII (maladie de Willebrand de type 2N).

## *ii. Autres fonctions du VWF*

Le VWF est impliqué dans de nombreux processus physiologiques autres que l'hémostase <sup>[31]</sup>.

### Rôle pro-inflammatoire du VWF

Le VWF joue un rôle actif dans la réaction inflammatoire. Les complexes VWF-plaquettes, formés à la surface de l'endothélium activé, participent au recrutement des leucocytes circulants au site de l'inflammation. Ces complexes VWF-plaquettes favoriseraient les étapes de rolling et d'adhésion leucocytaire <sup>[35]</sup> ainsi que l'extravasation leucocytaire <sup>[36]</sup>. Ces observations concordent avec la capacité du VWF à se lier à différents récepteurs membranaires leucocytaires (PSGL-1,  $\beta$ 2 intégrine et Siglec-5) <sup>[31]</sup>, ainsi qu'aux « neutrophil extracellular traps » (NETs). Cette liaison du VWF aux NETs repose sur une interaction électrostatique entre le domaine A1 du VWF chargé positivement et l'ADN, constituant principal des NETs chargé négativement, et nécessite la présence de forces de cisaillement <sup>[37]</sup>. Les NETs, d'identification récente, sont des filaments d'ADN décondensés associés à des protéines granulaires de type histones, qui sont libérés par les leucocytes activés à l'issue d'un programme de mort cellulaire spécifique <sup>[38]</sup>. Au-delà de leur rôle anti-microbien, les NETs ont également des effets pro-thrombotiques et cytotoxiques <sup>[39]</sup>.

Une étude récente suggère ainsi l'intérêt d'une inhibition ciblée du VWF pour réduire l'inflammation tissulaire *in-vivo*. Dans un modèle murin de vascularite leucocytoclasique par

dépôts de complexes immuns (modèle d'Artus), l'utilisation d'un anticorps polyclonal anti-VWF induit une nette régression des lésions inflammatoires cutanées via l'inhibition de l'extravasation leucocytaire. De façon notable, cet effet anti-inflammatoire ne s'accompagne pas de manifestations hémorragiques puisque l'anticorps anti-VWF utilisé n'interfère pas avec les fonctions pro-hémostatiques du VWF <sup>[40]</sup>.

D'autres études suggèrent également l'intérêt d'inhiber cette fonction pro-inflammatoire du VWF dans les pathologies thrombotiques artérielles et veineuses. Un modèle murin de thrombose veineuse profonde (TVP), induite par une sténose partielle de la veine cave inférieure, suggère ainsi l'implication du VWF à différentes étapes du processus de TVP. L'interaction VWF-GpIba serait essentielle au recrutement des plaquettes et à l'interaction entre plaquettes et cellules de l'immunité innée observée à la phase initiale de la TVP <sup>[41]</sup>. Secondairement, l'interaction VWF-NETs favoriserait la propagation du processus thrombotique <sup>[41]</sup>. La lutte contre l'inflammation constitue également un nouvel axe de recherche dans l'infarctus cérébral en vue d'une meilleure prévention des phénomènes thrombo-inflammatoires à l'origine des lésions d'ischémie-reperfusion (I/R), sur lesquelles la thrombolyse semble peu efficace <sup>[42]</sup>. Différents modèles animaux suggèrent le VWF comme une cible candidate d'intérêt pour la prévention des lésions I/R. La ligature puis la reperfusion de l'artère cérébrale moyenne induit ainsi un infarctus cérébral moins sévère chez les souris génétiquement déficientes en VWF (VWF<sup>-/-</sup>) vs contrôles. Inversement, la restauration d'une synthèse endogène de VWF par injection hydrodynamique de VWF sauvage à une souris VWF<sup>-/-</sup> restaure sa susceptibilité à l'infarctus cérébral <sup>[43]</sup>. Les formes VWF-THPM pourraient être plus particulièrement en cause dans l'apparition des lésions I/R car l'ADAMTS13 semble avoir un rôle protecteur vis à vis de ces lésions, en permettant une limitation de la taille de l'infarctus dans ces modèles animaux <sup>[44]</sup>.

### Rôle anti-angiogénique du VWF

La première étude expérimentale à établir un lien entre VWF et angiogenèse date de 2011. Cette étude soutient un rôle du VWF endothélial dans la régulation négative de l'angiogenèse. L'inhibition de l'expression endothéliale du VWF par siRNA induit une augmentation de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse contrôlées par le récepteur VEGF-R2 (vascular endothelial growth factor receptor 2). De plus, dans un modèle de souris VWF<sup>-/-</sup>, cette étude rapporte une augmentation conjointe de l'angiogenèse (dans un modèle sous-cutané de Matrigel) et de la densité capillaire auriculaire, par rapport à des souris sauvages contrôles [45]. Cette même équipe a par ailleurs mis en évidence une augmentation du nombre de cellules endothéliales circulantes et des niveaux élevés de cytokines pro-angiogéniques chez les patients atteints de VWD [46]. Randi et al. propose ainsi un modèle où le VWF régulerait négativement l'angiogenèse dépendante du récepteur VEGF-R2. (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2) selon deux voies, intra- et extra-cellulaire, impliquant respectivement l'angiopoïétine 2 et l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  [47].

Certaines formes de maladie de Willebrand (VWD) étant caractérisées par une incidence élevée d'hémorragies digestives sur angiodyplasies, ces études ont soulevé un vif intérêt en suggérant l'hypothèse d'un lien direct entre certaines anomalies du VWF et une altération du processus angiogénique. Les hémorragies digestives liées aux angiodyplasies compliquent plus volontiers la VWD de type 3 (dans lesquelles le déficit en VWF concerne à la fois les compartiments endothélial, plasmatique et plaquettaire), et les formes constitutionnelles ou acquises associées à une perte des multimères de haut poids moléculaires du VWF (VWF-HPM) dans le compartiment plasmatique. Ce dernier point suggère que le VWF plasmatique, notamment les VWF-HPM, pourrait également jouer un rôle physiologiquement essentiel dans la régulation négative de l'angiogenèse, selon un mécanisme qui reste à définir [31].



### Rôles du VWF dans la prolifération cellulaire et l'apoptose

De façon inattendue, le VWF a récemment été impliqué dans l'induction de mécanismes pro-apoptotiques. L'interaction VWF-GpIb $\alpha$  pourrait dans certaines conditions induire l'apoptose plaquettaire <sup>[48]</sup>. L'interaction VWF-intégrine  $\alpha v\beta 3$  aurait un effet anti-prolifératif sur certaines lignées tumorales en entraînant l'apoptose des cellules cancéreuses <sup>[49]</sup>. Inversement, certaines tumeurs pourraient développer un mécanisme d'échappement à cet effet anti-tumoral du VWF, via la synthèse d'une protéase capable de cliver les multimères de VWF <sup>[50]</sup>. Le lien récent établi entre le VWF et l'artériopathie cérébrale CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcordial infarcts and leukoencephalopathy) soulève de nouvelles interrogations sur l'implication du VWF dans le remodelage de la paroi vasculaire. En cas de dépôts importants de VWF dans l'intima, l'interaction entre VWF et cellules musculaires lisses se traduirait par une modification délétère du phénotype de ces cellules, en lien avec l'induction de voies de signalisation intra-cellulaires spécifiques <sup>[51]</sup>.

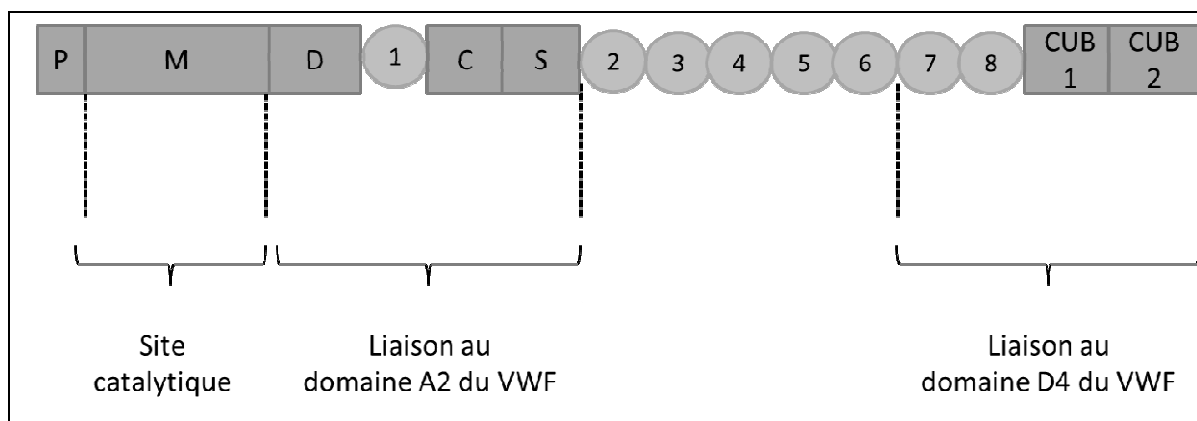
### VWF et mégacaryocytopoïèse

Le VWF intervient à différents stades de la thrombopoïèse. Une anomalie de la maturation mégacaryocytaire a ainsi été reportée en présence de la mutation p.R1308P responsable d'une MW de type 2B <sup>[52]</sup>. Plus récemment, une étude suggère l'importance conjuguée du VWF et des forces de cisaillement pour la maturation terminale des pro-plaquettes en plaquettes discoïdes dans la circulation <sup>[53]</sup>.

## 2. L'ADAMTS13

### a. Biosynthèse et structure primaire

Le gène *ADAMTS13* (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin domains-13), situé sur le bras long du chromosome 9 (9q34), a une taille de 37kb et est constitué de 29 exons <sup>[54]</sup>. Son transcript principal est un ARNm de 4,7kb codant pour un précurseur protéique de 1427 aa : la pro-ADAMTS13. Il existe également d'autres transcrits, issus d'épissages alternatifs, dont la fonction est inconnue. La pro-ADAMTS13 comporte un peptide signal (33 aa), un propeptide (41 aa) et la chaîne monomérique mature (1353 aa). La structure primaire de l'ADAMTS13 est composée d'une succession de domaines structuraux caractéristiques de la famille ADAMTS : un domaine métalloprotéase N-terminal (aa 75-290), un domaine désintégrine (aa 291-385), un premier motif thrombospondine : TSP-1 (aa 386-439), un domaine riche en cystéines : Cystein-rich (aa 440-555), 7 motifs TSP-1 additionnels (aa 686-1191) et 2 domaines CUB : complément components C1r/C1s, Urinary EGF et Bone morphogenetic protein (aa 1192-1427) [Levy GG et al, 2001] (**Figure 6**). Cette protéine monomérique a une masse moléculaire de 190 kDa.



**Figure 6: Structure primaire multi-domaines de la pro-ADAMTS13**

On distingue de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale : le peptide signal (S), le domaine métalloprotéase (M) contenant le site catalytique, le domaine Désintégrine (D), un 1<sup>er</sup> motif thrombospondine (1), le domaine cystéin-rich (C), le domaine Spacer (S), 7 motifs additionnels thrombospondine (2 à 8) et 2 domaines CUB.

### **b. Sécrétion et clairance**

L'ADAMTS13 est synthétisée principalement par les cellules stellaires péri-sinusoïdales hépatiques <sup>[55]</sup> et les cellules endothéliales <sup>[56]</sup>. Sa demi-vie est de 2 à 3 jours. Sa concentration plasmatique est d'environ 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

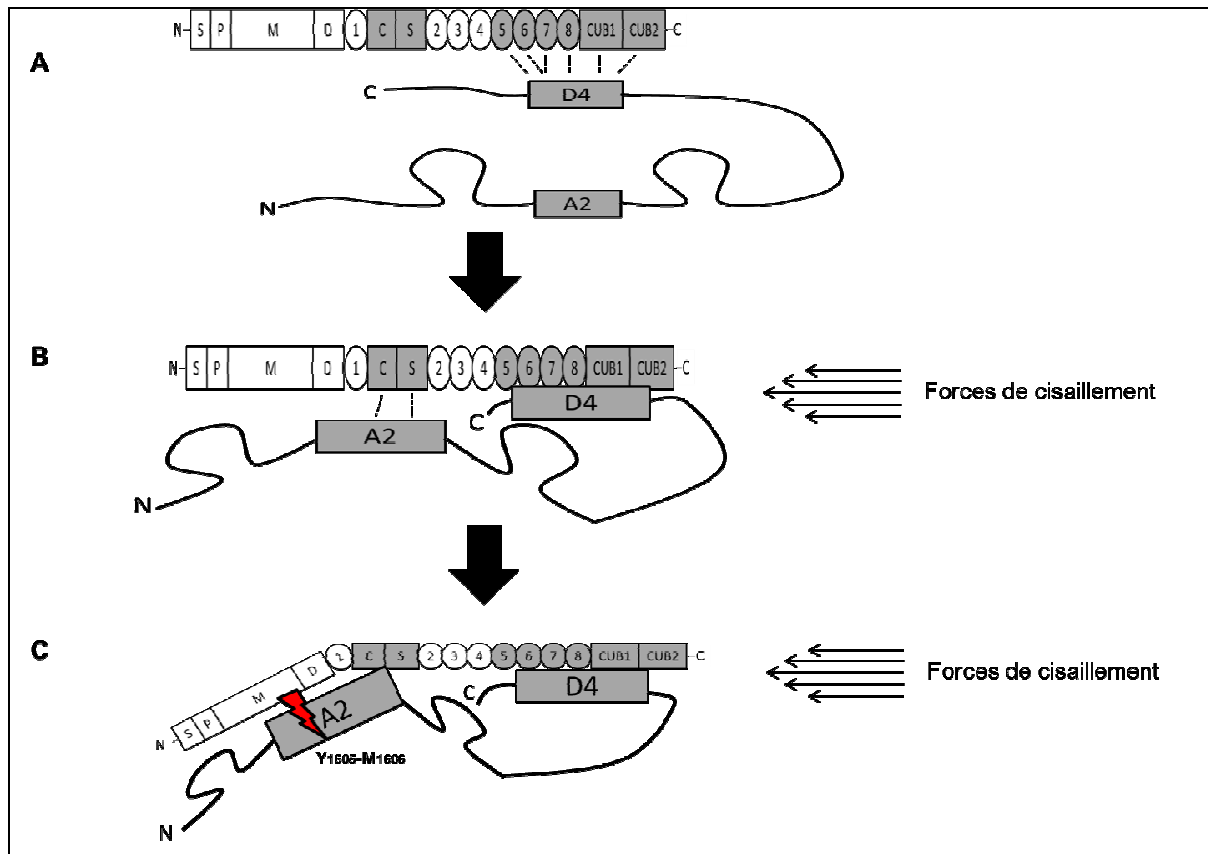
### **c. Fonction de l'ADAMTS13 : la protéolyse du VWF**

La biosynthèse du VWF génère un ensemble hétérogène de multimères de différentes tailles, pouvant inclure jusqu'à 60 sous-unités dimériques, qui sont stockés dans les corps de Weibel-Palade. Dans le plasma normal, les multimères de VWF contiennent de 2 à 40 sous-unités et ont donc une taille moyenne inférieure aux multimères stockés au sein des corps de Weibel-Palade. Ceci témoigne de l'existence de mécanismes régulant la taille des multimères de VWF dans le plasma. La protéolyse du VWF par l'ADAMTS13 joue un rôle majeur dans cette régulation <sup>[31]</sup>.

#### ***i. Bases moléculaires de la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13***

L'ADAMTS13 a pour substrat unique le VWF, qu'elle protéolyse au niveau d'une liaison peptidique unique localisée dans le domaine A2 entre les résidus Tyrosine 1605 et Méthionine 1606 (Y<sup>1605</sup>-M<sup>1606</sup>) <sup>[57]</sup>. Ce clivage s'observe après une élongation préalable du VWF, qui nécessite une dénaturation chimique du VWF par de faibles concentrations de guanidine-HCl ou d'urée en phase statique <sup>[57]</sup>, ou la présence de forces de cisaillement élevées en conditions de flux <sup>[58]</sup>. Les bases moléculaires de la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13 sont désormais bien établies <sup>[59]</sup>. Cette protéolyse nécessite une interaction préalable entre le VWF et l'ADAMTS13, via des exosites spécifiques localisés au niveau des domaines A2 et D4 du VWF <sup>[60,61]</sup>. Cette interaction VWF-ADAMTS13 peut être modélisée comme un processus

multi-étapes nécessaire à l'orientation correcte du domaine catalytique métalloprotéase de l'ADAMTS13 vis-à-vis du site de clivage Tyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup> [62] (**Figure 7**). La protéolyse du VWF par l'ADAMTS13 est un phénomène extrêmement dynamique. Il a été en effet estimé que cette réaction protéolytique interviendrait après environ 200 secondes *in-vivo* [63].



**Figure 7: Représentation schématique de l'interaction multi-sites VWF-ADAMTS13** (préalable au clivage protéolytique du domaine A2 du VWF par le domaine métalloprotéase de l'ADAMTS13)

*ii. Régulation mécano-enzymatique de la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13*

La protéolyse du VWF par l'ADAMTS13 en conditions de flux est un processus mécano-enzymatique complexe soumis à une régulation temporo-spatiale <sup>[14] [16]</sup>.

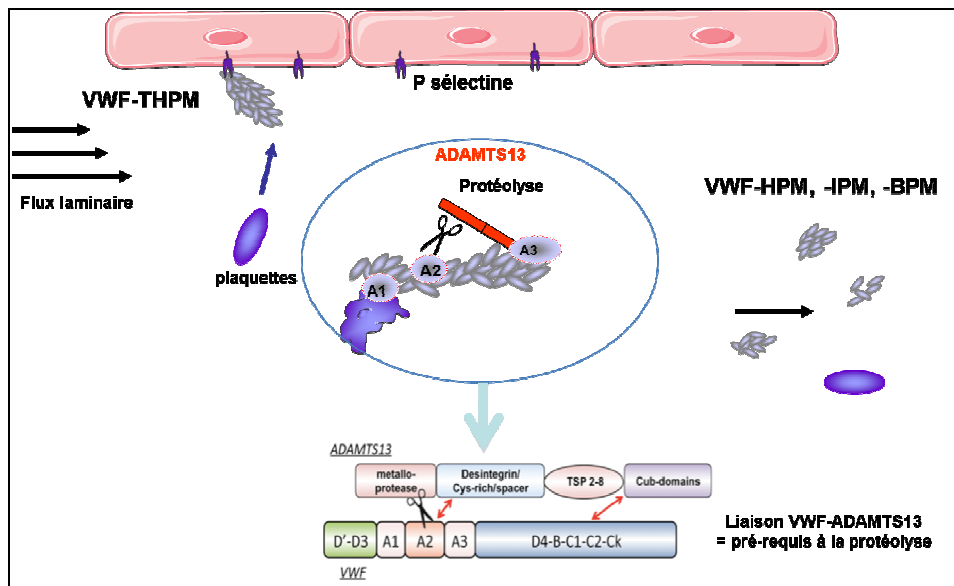
En conditions laminaires, la vitesse d'écoulement du sang augmente de la paroi vers le centre du vaisseau. Le flux sanguin peut alors être modélisé comme une succession de couches concentriques, ou lamina, s'écoulant à des vitesses variables, maximales au centre du vaisseau et nulles le long de la paroi. Ce différentiel de vitesses génère des forces de cisaillement (ou shear stress) d'intensité maximale le long de la paroi vasculaire. Ces forces de cisaillement sont d'intensité variable dans l'arbre circulatoire et sont très intenses dans la microcirculation (artérioles et capillaires). Ces forces hydrodynamiques génèrent des contraintes mécaniques proportionnelles à la taille des molécules ou cellules circulantes dans le sang. La structure polymérique et la flexibilité conformationnelle du VWF lui confèrent une sensibilité unique aux forces de cisaillement issues du flux sanguin.

En présence d'un flux laminaire, les multimères libres dans la circulation ont leurs deux extrémités localisées dans des lamina distinctes, et qui diffèrent donc par leur vitesse d'écoulement. Ce différentiel de vitesse génère une contrainte hydrodynamique d'intensité plus importante sur l'extrémité la plus proche de la paroi vasculaire provoquant la rotation rapide des multimères sur eux-mêmes. De plus, à chaque cycle de rotation à 360°, les multimères expérimentent deux cycles d'élongation/compaction extrêmement dynamiques. Le flux laminaire peut ainsi être modélisé comme la résultante d'un écoulement de type rotationnel dans le plan sagittal et d'un écoulement de type élongationnel dans le plan horizontal <sup>[14] [16]</sup>.

En raison du temps réduit de la phase d'élongation, l'extension des multimères est limitée en condition laminaire ce qui permet à la fois de prévenir toute interaction spontanée avec les plaquettes circulantes et de protéger le VWF d'une dégradation spontanée par l'ADAMTS13. Trois facteurs additionnels contribuent à une régulation temporo-spatiale de la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13 en conditions de flux : 1) A intensité égale de forces de cisaillement, la sensibilité du VWF à l'élongation est corrélée à la longueur des multimères car ces derniers subissent des contraintes hydromécaniques plus importantes 2) La liaison du VWF à un récepteur cellulaire (GpIb $\alpha$ , P-sélectine) annule la composante rotationnelle au profit de la composante élongationnelle du flux. A intensité équivalente de shear stress, le VWF lié s'allonge ainsi plus que le VWF libre dans le plasma et est plus susceptible à l'action protéolytique de l'ADAMTS13 3) En cas de brèche vasculaire, les conditions de flux sont modifiées avec la présence de deux zones d'écoulement élongationnel au niveau même de la brèche et dans la zone vasculaire en amont siège d'une vasoconstriction. Ces conditions rhéologiques créent des gradients de pression responsables d'une augmentation très importante des forces de cisaillement augmentant à la fois l'affinité du VWF à la GpIb $\alpha$  (formation du thrombus plaquettaire) et sa sensibilité à la protéolyse par l'ADAMTS13 en périphérie du caillot (régulation négative de la croissance du thrombus).

Le clivage du VWF par l'ADAMTS13 n'intervient ainsi que dans certaines conditions, en fonction de l'accessibilité du site de clivage Y<sup>1605</sup>-M<sup>1606</sup> à son enzyme. L'ADAMTS13 intervient pour prévenir la libération dans le plasma des multimères de très grande taille, sécrétés par l'endothélium (multimères de très haut poids moléculaire, VWF-THPM). L'ADAMTS13 protéolyse ces mégamultimères en provenance des corps de Weibel-Palade, alors qu'ils sont encore liés à l'endothélium via la P-sélectine ou l'intégrine  $\alpha\beta 3$ . Cette liaison du VWF et la présence de forces de cisaillement élevées favorisent en effet

l'élongation de ces mégamultimères VWF-THPM qui exposent alors la liaison peptidique Y<sup>1605</sup>-M<sup>1606</sup>. L'ADAMTS13 prévient ainsi la libération de ces multimères hyper-fonctionnels dans le plasma. Leur clivage génère des multimères de taille inférieure (VWF-HPM, VWF-IPM, VWF-BPM), qui dès leur libération dans le plasma adoptent une conformation globulaire les protégeant de toute dégradation supplémentaire par l'ADAMTS13 (**Figure 8**).



**Figure 8: Régulation de la taille du VWF par l'ADAMTS13.**

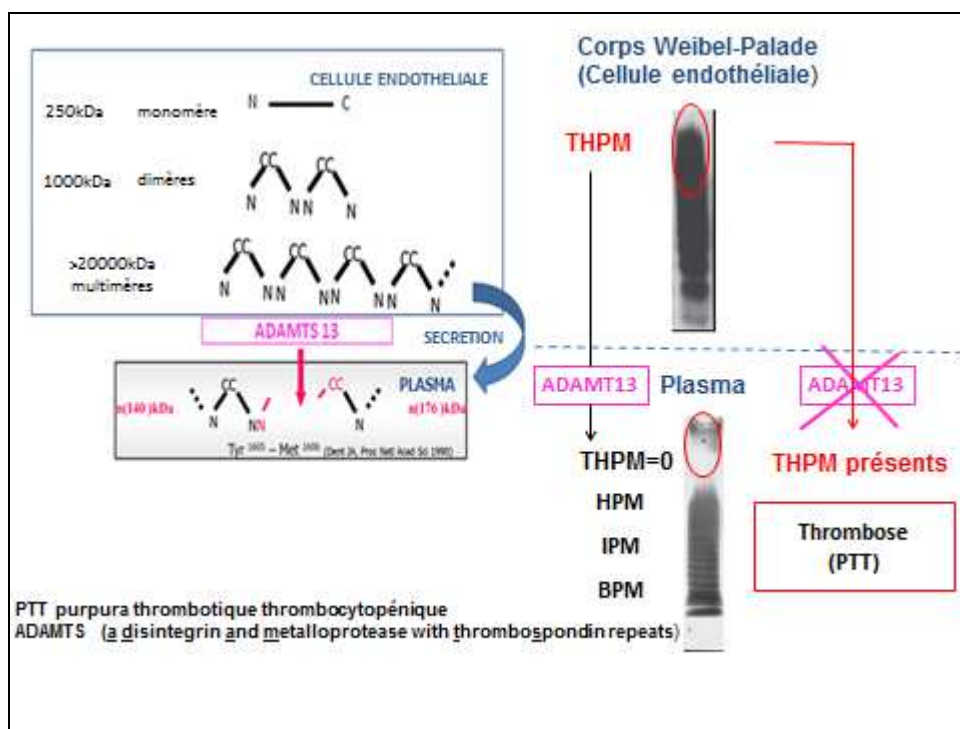
Protéolyse des multimères de très haut poids moléculaire (VWF-THPM) liés à l'endothélium (via la P-sélectine) et aux plaquettes (via la GPIbα) en multimères de taille inférieures (VWF-HPM, -IPM, -BPM).

Au sein d'un thrombus artériel en formation, le VWF lié aux plaquettes constitue un autre substrat préférentiel de l'ADAMTS13. La liaison du VWF à la GPIbα plaquettaire favorise l'ouverture du domaine A2 adjacent et sa protéolyse par l'ADAMTS13. Cette dernière en diminuant la taille des multimères de VWF au sein du thrombus artériel contribue à prévenir l'occlusion complète de l'artère par le thrombus. Ce rôle de l'ADAMTS13 est essentiel dans la microcirculation où l'agrégation plaquettaire est essentiellement dépendante du VWF. L'ADAMTS13 joue ainsi un rôle majeur dans la limitation de la taille des multimères de

VWF plasmatique et dans la régulation négative de la croissance du thrombus artériel dans la microcirculation.

iii. Exemples de dysrégulation de la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13

Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) et la maladie de Willebrand (VWD) de type 2A témoignent de l'importance de la régulation de la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13. Le PTT est une micro-angiopathie thrombotique dont la survenue est associée à un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 [54]. Il en résulte une absence de protéolyse du VWF à l'origine d'une présence anormale de VWF hautement multimérisé d'origine endothéliale (VWF-THPM) dans la circulation (**Figure 9**).



**Figure 9: Présence anormale de multimères de très haut poids moléculaire dans le sang en l'absence d'ADAMTS13 fonctionnelle : situation à risque de purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT).** A l'état normal, l'ADAMTS13 clive les multimères de très haut poids moléculaire (THPM) synthétisés dans la cellule endothéliale puis stockés dans les corps de Weibel-Palade, en multimères de plus petite taille dit de haut poids moléculaire (HPM), poids moléculaire intermédiaire (IPM) ou bas poids moléculaire (BPM).



Dans certaines circonstances associées à une activation endothéliale majeure, ces VWF-THPM peuvent induire une activation plaquettaire spontanée dans la microcirculation à l'origine de thrombi disséminés. Ces thrombi induisent des défaillances d'organes multiples, une fragmentation mécanique des hématies responsable d'une anémie hémolytique mécanique et une thrombopénie de consommation.

La VWD de type 2A est une pathologie hémorragique héréditaire secondaire à une protéolyse excessive du VWF par l'ADAMTS13. Elle est causée en règle par une mutation altérant la conformation du domaine A2 du VWF et augmentant l'exposition du site de clivage Y<sup>1605</sup>-M<sup>1606</sup>. Ceci entraîne la protéolyse des multimères de plus haut poids moléculaire (VWF-HPM et parfois VWF-IPM) indispensables à la fonction pro-hémostatique du VWF.

## **II. La maladie de Willebrand (VWD)**

La première observation clinique de maladie de Willebrand (Von Willebrand Disease, abrégé VWD dans la nomenclature internationale) date de 1926. Le Dr Erick Von Willebrand rapporte alors le cas d'une petite fille de 5 ans consultant pour un syndrome hémorragique cutanéomuqueux et qui décédera secondairement à l'âge de 13 ans de ménorragies. L'anamnèse familiale confirme alors l'existence de manifestations hémorragiques similaires du côté paternel et maternel, touchant indifféremment les 2 sexes, et suggérant ainsi l'origine génétique de cette pathologie hémorragique. Cette nouvelle pathologie, distincte de l'hémophilie déjà décrite à l'époque, est initialement désignée sous le terme de « pseudo-hémophilie ». La purification de la protéine puis le séquençage du gène du VWF interviendront un demi-siècle plus tard.

### **1. Définition et prévalence**

#### **a. VWD constitutionnelle**

La VWD constitutionnelle est définie comme une pathologie hémorragique d'origine génétique, secondaire à un défaut de la concentration, de la structure ou de la fonction du VWF, indépendamment de la localisation ou non de la mutation causale sur le gène *VWF* <sup>[64]</sup>. Elle est considérée comme la plus fréquente des pathologies hémorragiques constitutionnelles. Si sa prévalence a été initialement estimée à environ 1 % de la population générale <sup>[65,66]</sup>, ce chiffre a secondairement été revu à la baisse aux alentours de 0,01 % <sup>[67]</sup>. La forme la plus sévère de VWD (VWD de type 3) est rare de l'ordre de  $1/10^6$  individus.

### **b. VWD acquise**

La VWD acquise ou syndrome de Willebrand acquis (acquired von Willebrand disease, abrégé AVWS dans la nomenclature internationale) est une pathologie hémorragique dont l'expression clinico-biologique peut être similaire à la VWD constitutionnelle. L'apparition récente d'un syndrome hémorragique cutanéomuqueux, en l'absence d'antécédents hémorragiques familiaux ou personnels, est très évocateur du diagnostic. La mise en évidence d'une VWD acquise nécessite un bilan étiologique à la recherche d'une pathologie sous-jacente susceptible d'interférer avec la synthèse, la protéolyse, la clairance ou la fonction du VWF. Bien que rare, sa prévalence pourrait être sous-estimée en raison de la méconnaissance de cette pathologie hémorragique par la communauté médicale et du caractère non-spécifique des manifestations hémorragiques associées.

## **2. Physiopathologie de la VWD**

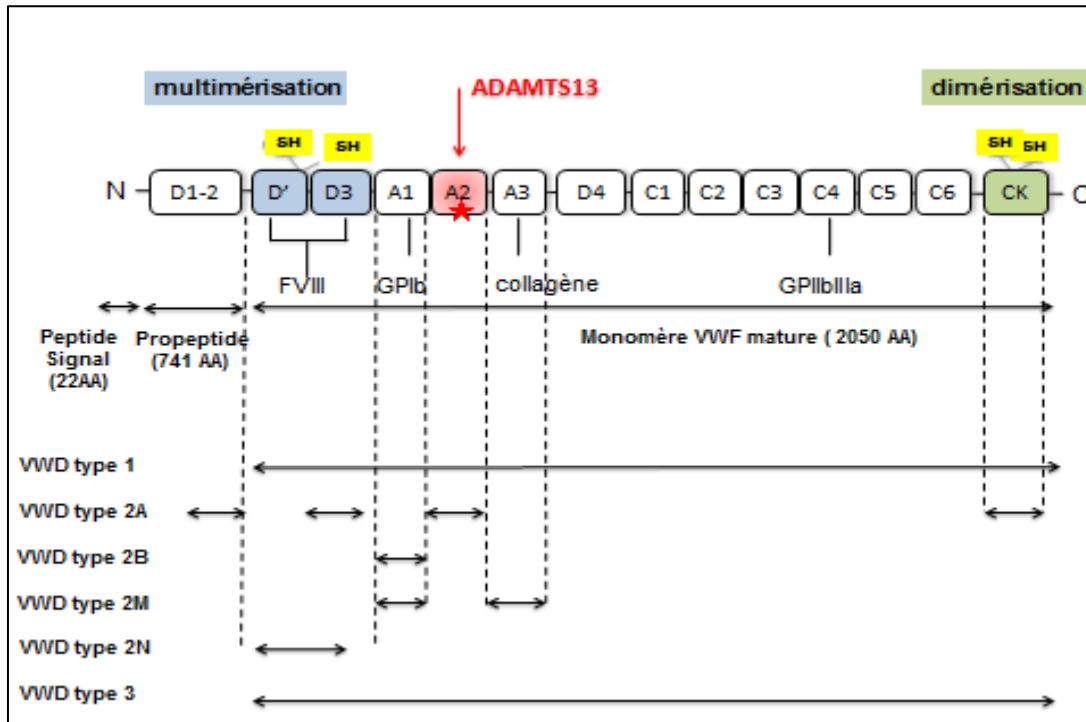
### **a. Classification et bases moléculaires de la VWD constitutionnelle**

La classification internationale de la VWD constitutionnelle, initialement publiée en 1994 puis révisée en 2006, repose sur une approche phénotypique. Elle individualise 3 types principaux de VWD : les déficits quantitatifs partiels (type 1) ou complet (type 3), et les déficits qualitatifs (type 2) comprenant quatre sous-types : 2A, 2B, 2M et 2N <sup>[64]</sup> (**Table 1**). La transmission de la VWD intervient le plus souvent selon un mode autosomal dominant, à l'exception des types 3, 2N, ainsi que de rares variants 2A dont la transmission est récessive.

Type	Sous-type	Base(s) moléculaires du déficit en VWD
1		<u>Déficit quantitatif partiel en VWF</u>
2		<u>Déficit qualitatif en VWF (variants moléculaires)</u>
	2A	Défaut d'interaction du VWF avec les plaquettes et le sous-endothélium secondaire à l'absence des VWF-HPM
	2B	Augmentation de l'affinité du VWF pour les plaquettes
	2M	Défaut d'interaction du VWF avec les plaquettes ou le sous-endothélium malgré l'absence de déficit quantitatif en VWF-HPM
	2N	Diminution de l'affinité du VWF pour le FVIII
3		<u>Déficit quantitatif total en VWF</u>

**Table 1: classification ISTH de la maladie de Willebrand constitutionnelle**

Les mutations causales sont variées avec une distribution hétérogène sur l'ensemble du gène dans les types 1 et 3, et une distribution relativement restreinte dans le type 2 où elles sont le plus souvent localisées à proximité des sites fonctionnels d'interaction compromettant la liaison du VWF à un de ses ligands (essentiellement plaquettes, collagène et facteur VIII (Figure 10).



**Figure 10: Localisation des anomalies de traduction en fonction du type de maladie de Willebrand**

### *i. Type 1*

Le type 1 est défini comme un déficit quantitatif partiel en VWF. Il se traduit par une diminution proportionnelle de la concentration protéique (VWF:Ag) et de l'activité fonctionnelle (activité cofacteur de la ristocétine, VWF:RCo) du VWF, sans anomalie significative de la structure multimérique. La pénétrance intra-familiale du phénotype hémorragique et la probabilité de retrouver une mutation sur le gène *VWF* varient selon l'intensité du déficit. Pour des taux de VWF:Ag < 30 UI. dL<sup>-1</sup>, le génotypage objective

habituellement une mutation à forte pénétrance affectant soit la sécrétion, soit la clairance du VWF. Inversement, pour des taux compris entre 30 et 50 UI.dL<sup>-1</sup>, les rares mutations mises en évidence ne co-ségrégent pas avec le phénotype hémorragique [68,69]. Ceci suggère l'existence de polymorphismes génétiques hors locus *VWF* affectant la sécrétion ou la clairance plasmatique du VWF.

## *ii. Type 2*

Le type 2 regroupe les variants qualitatifs de VWD à l'origine d'une interaction anormale du VWF avec les plaquettes (2A, 2B et 2M) ou le FVIII (2N).

### Sous-type 2A

Dans le variant 2A, la diminution de l'affinité du VWF plasmatique pour la GpIb $\alpha$  plaquettaire est secondaire à un déficit en multimères de haut poids moléculaire (VWF-HPM).

Deux classifications répertorient les différents mécanismes, parfois associés, sous-jacents au déficit en VWF-HPM. L'étude du profil multimérique obtenu après électrophorèse en conditions non-dénaturantes sur un gel de SDS-agarose permet de distinguer quatre variants dans le sous-type 2A : 2A (IIA), 2A (IIC), 2A (IID) et 2A (IIE). Cette classification phénotypique se base sur l'analyse de la distribution multimérique et sur la présence ou non des bandes satellites [70]. L'analyse des bandes satellites, marqueurs de la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13, s'apparente ainsi à une étude semi-quantitative de la protéolyse du VWF [71]. La protéolyse du VWF par l'ADAMTS13 est ainsi augmentée dans les variants 2A (IIA) mais diminuée voire absente pour les sous-types 2A (IIC), 2A (IID) et 2A (IIE) par rapport à des sujets témoins [72] (**Table 2**). L'approche génotypique [73] repose sur l'expression de la protéine mutante *in vitro* par transfection cellulaire eucaryote. Les mutations associées aux variants 2A (IIA), localisées essentiellement au niveau du domaine A2, sont ainsi classées en 2 groupes. Les mutations du groupe 1 affectent au niveau endothélial l'assemblage ou la

sécrétion des VWF-HPM. Les mutations du groupe 2 n'interfèrent pas avec l'assemblage ou la sécrétion du VWF mais elles augmentent la susceptibilité des VWF-HPM à leur protéolyse par l'ADAMTS13 dans le plasma. Ainsi, bien que la perte des VWF-HPM soit une caractéristique commune à l'ensemble des variants 2A, les mécanismes sous-jacents au déficit varient selon la mutation causale.

### Sous-type 2B

Dans le variant 2B, les mutations en cause modifient la conformation du domaine A1 en une conformation « active » permettant la liaison spontanée du VWF à la GpIb $\alpha$  plaquettaire (mutation « gain de fonction »). Cette adsorption spontanée du VWF aux plaquettes serait responsable de la thrombopénie et de la disparition des multimères VWF-HPM du plasma. Le VWF lié à la surface des plaquettes est en effet plus facilement protéolysé par l'ADAMTS13 [74]. La liaison entre le domaine A1 du VWF et la GpIb $\alpha$  plaquettaire retentirait sur la conformation du domaine voisin A2, facilitant ainsi l'accès de l'ADAMTS13 au site de clivage Y<sup>1605</sup>-M<sup>1606</sup> [75]. D'après des études plus récentes, la physiopathologie de la thrombopénie apparaît plus complexe avec la description de mécanismes additionnels pour certaines mutations : anomalies de la mégacaryocytopoïèse [52], clairance accélérée des complexes VWF-plaquettes par les macrophages spléniques et hépatiques dans un modèle murin [22]. La mutation 2B p.V1316M (initialement décrite dans le syndrome de Montréal, une variété de thrombopénie familiale) se caractérise notamment par une thrombopathie, secondaire à une anomalie de l'activation de GpIIb/IIIa (signalisation « inside-out ») [76]. Cette découverte fournit un nouvel élément de compréhension de la sévérité du phénotype hémorragique associé à la mutation 2B p.V1316M [77].

	Domaine	Mode de Transmission	VWF-HPM	Bandes satellites	Bases moléculaires du déficit en VWF
2A(IIA)	A2	Dominant	↓↓↓	Accentuées	- Groupe 1 : Anomalie de la multimérisation du VWF Anomalies du stockage du VWF au niveau endothélial - Groupe 2 excès de protéolyse du VWF par l'ADAMTS13 dans le plasma
2A(IIC)	D1/D2	Récessif	↓↓	Absentes	Anomalie de la multimérisation du VWF
2A(IID)	CK	Récessif	↓↓	Absentes	Anomalie de dimérisation du VWF
2A(IIE)	D3	Dominant	↓↓ ou présents	Absentes	Anomalie de multimérisation du VWF Rétention intra-endothéliale du VWF Augmentation de la clairance

**Table 2 : Ancienne classification phénotypique de la VWD constitutionnelle de type 2A**



### Sous-type 2M

Dans le variant 2M, les VWF-HPM sont présents mais qualitativement anormaux avec une affinité diminuée pour la GpIb $\alpha$  (domaine A1) et/ou le collagène sous-endothélial (domaines A1 et A3).

### Sous-type 2N

Le variant 2N résulte d'une absence (ou franche diminution) de la liaison du VWF au FVIII. Cette anomalie de la liaison VWF-FVIII se traduit par un déficit plasmatique isolé en FVIII (homozygotes ou hétérozygotes composites) contrastant avec des taux normaux ou peu diminués de VWF (VWF:Ag et VWF:RCo).

### *iii. Type 3*

Le type 3 est défini comme un déficit quantitatif complet en VWF. La symptomatologie comprend des manifestations hémorragiques de type coagulopathie (hématomes profonds et hémarthroses) liées à la sévérité du déficit secondaire en FVIII en plus des manifestations hémorragiques cutanéomuqueuses classiques de la VWD.

### **b. Physiopathologie de la VWD acquise**

La dénomination « syndrome de Willebrand acquis » (AVWS) apparaît plus appropriée au vu de la diversité des pathologies sous-jacentes à un déficit acquis en VWF. Ces nombreuses étiologies illustrent la diversité des mécanismes sous-jacents répertoriés à ce jour: diminution de la synthèse du VWF en cas d'hypothyroïdie, inhibition de la liaison du VWF au collagène ou aux plaquettes <sup>[78]</sup> en présence d'auto-anticorps neutralisants, augmentation de la clairance

plasmatique du VWF en présence d'une dysglobulinémie monoclonale <sup>[79]</sup>, adsorption du VWF plasmatique sur les plaquettes dans certains cas de thrombocytémie essentielle <sup>[80]</sup> ou sur des cellules carcinomateuses <sup>[81]</sup>, protéolyse du VWF plasmatique en présence de forces de cisaillement élevées générées par un syndrome myéloprolifératif <sup>[82]</sup>, un rétrécissement aortique sévère <sup>[83]</sup> ou une assistance ventriculaire gauche à flux continu <sup>[84]</sup>. La mise en place d'un registre international avait initialement mis en évidence une nette prédominance des étiologies myélo-prolifératives (15%), lympho- prolifératives (48%) ou cardio-vasculaires (21%) <sup>[85]</sup>. D'après des études de cohorte plus récentes, les cardiopathies à forces de cisaillement élevées, de caractérisation plus récente, seraient actuellement la cause la plus fréquente de VWD acquise <sup>[85,86,87]</sup>.

### **3. Manifestations cliniques**

La VWD se traduit par un syndrome hémorragique affectant préférentiellement la peau (ecchymoses, saignement prolongé lors de plaie cutanée) et les muqueuses (hyperménorrhée, épistaxis, gingivorragie, hémorragies digestives). Les saignements post-traumatiques ou post-chirurgicaux, notamment lors d'amygdalectomie ou d'avulsions dentaires, sont classiquement observés en l'absence de traitement hémostatique préventif. Plus rarement, on observe la survenue d'hémarthroses ou d'hématomes dans les formes de VWD associées à des taux très diminués de FVIII. L'intensité du syndrome hémorragique dans la VWD est cependant très hétérogène. Elle est globalement corrélée à la sévérité du déficit en VWF, en FVIII ou en plaquettes (pour le variant 2B) mais la pénétrance de la VWD peut être très variable au sein d'une même famille.

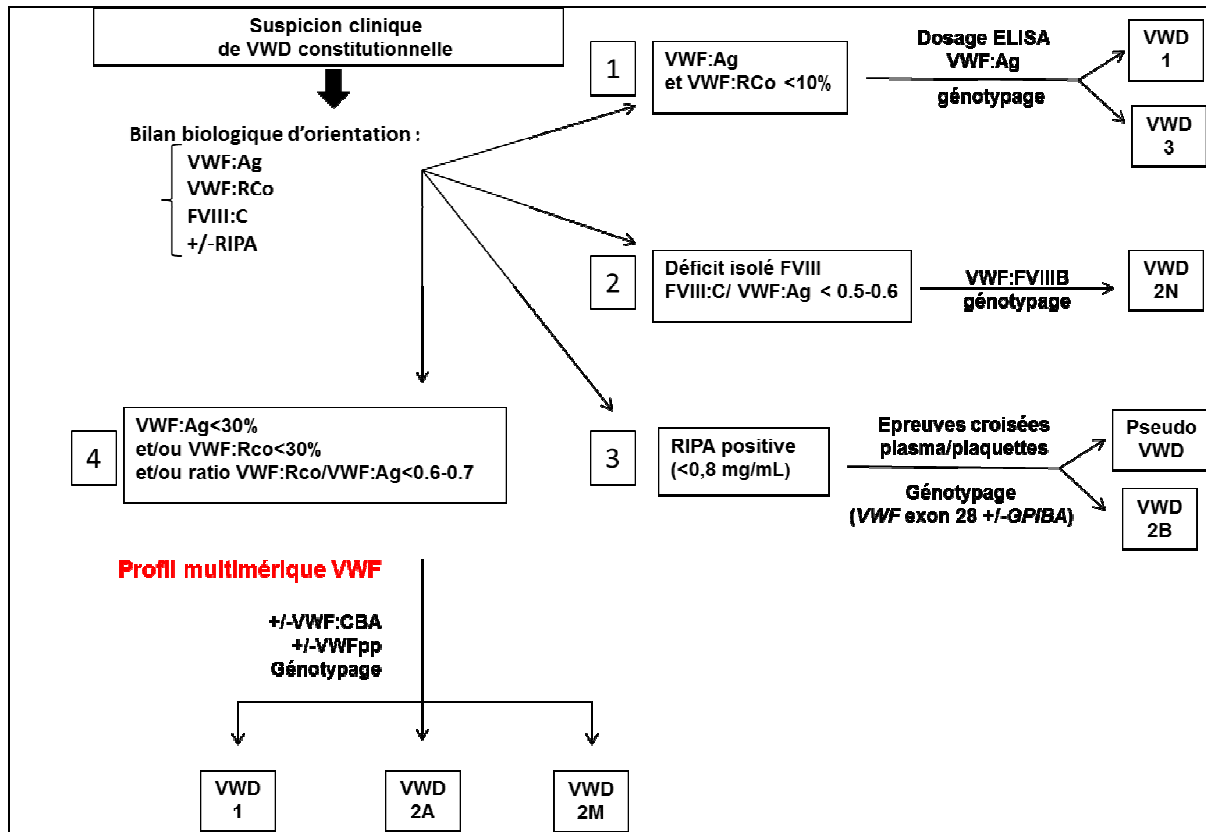
Bien que le syndrome hémorragique soit identique dans les formes constitutionnelle et acquise, la survenue de manifestations hémorragiques spontanées semble plus rare dans la VWD acquise, possiblement en lien avec l'intégrité du compartiment plaquettaire.

Les hémorragies digestives sont observées aussi bien dans la VWD acquise que dans la VWD constitutionnelle. Elles surviennent essentiellement dans les formes associées à un déficit en VWF-HPM, qui semblent associées à une prévalence plus élevée d'angiodysplasies digestives. La première étude à faire mention de ce lien entre VWD constitutionnelle et angiodysplasies digestives date de 1993. Cette étude de registre portant sur 4503 patients avait alors mis en évidence une prévalence d'angiodysplasies digestives de 2% dans la VWD de type 2 et de 4.5% dans la VWD de type 3, contrastant avec une prévalence nulle dans la VWD de type 1<sup>[88]</sup>. Cependant, la prévalence réelle des angiodysplasies digestives était probablement sous-estimée puisque les examens permettant une exploration de l'intestin grêle n'ont été introduits qu'ultérieurement : la vidéocapsule en 2000 et l'entéroscopie en 2004<sup>[89]</sup>. Par ailleurs, cette étude ne comportait pas d'analyse différenciée de la prévalence des angiodysplasies en fonction des sous-types de VWD de type 2 (2A, 2B, 2M et 2N). A ce sujet, une récente étude italienne souligne, au terme d'un suivi prospectif de deux ans, une incidence de 36% d'hémorragies digestives dans la VWD constitutionnelle de type 2A (absence de VWF-HPM) vs une incidence limitée à 3% dans la VWD de type 2M (présence de VWF-HPM)<sup>[90]</sup>. Une prévalence élevée d'hémorragies digestives a depuis été rapportée dans différentes formes de VWD acquise associées à un déficit en VWF-HPM : VWD acquise associée à une insuffisance mitrale<sup>[91]</sup>, VWD acquise associée aux assistances circulatoires mécaniques à flux continu<sup>[84, 92, 93]</sup>.

#### 4. Diagnostic biologique

Le bilan de 1<sup>ère</sup> intention en cas de suspicion de VWD comporte au minimum le dosage du FVIII, le dosage antigénique et la mesure de l'activité fonctionnelle du VWF (respectivement VWF:Ag et VWF:RCo), et la réalisation d'une agrégation plaquettaire à faibles concentrations de ristocétine (Ristocetin Induced Platelet Agregation, RIPA) si ce test est disponible. Le calcul des ratios FVIII / VWF:Ag et VWF:RCo / VWF:Ag fait partie intégrante de ce bilan de dépistage. La réalisation d'un temps d'occlusion sur PFA-100® peut s'avérer utile en raison de la sensibilité de ce test aux déficits quantitatif ou qualitatif en VWF, à l'exception de la VWD de type 2N<sup>[94]</sup> (voir Annexe, revue 2).

Le typage phénotypique d'une VWD requiert la réalisation d'examens biologiques plus spécialisés: étude de la distribution multimérique du VWF, dosage du propeptide (VWFpp) ou mesure de la liaison du VWF au collagène (VWF:CB). L'obtention du profil multimérique du VWF requiert la réalisation d'une électrophorèse le plus souvent sur un gel SDS-agarose, qui permet la séparation des multimères plasmatiques en fonction de leur poids moléculaire. Cet examen est capital pour le typage de la VWD, une fois écartés les diagnostics de VWD de type 2B et de type 2N. Il permet notamment la distinction entre VWD de type 2A (où il existe un déficit plasmatique en VWF-HPM et parfois en VWF-IPM) et VWD de type 2M (où tous les multimères sont présents) (**Figure 11**).



**Figure 11: Place de la détermination du profil multimérique du VWF dans la stratégie de diagnostic et de typage de la maladie de Willebrand**

A l'exception du bilan biologique nécessaire à la mise en évidence d'un auto-anticorps anti-VWF, les examens à visée diagnostique dans le syndrome de Willebrand acquis sont les mêmes que ceux utilisés dans la VWD constitutionnelle : VWF:Ag, VWF:RCo, VWF:CB, FVIII:C, et calcul des ratios VWF:RCo/VWF:Ag et VWF:CB/VWF:Ag. Cependant, leur sensibilité est parfois insuffisante surtout dans les VWD acquises d'origine cardiovasculaire [86]. Le diagnostic de certaines VWD acquises repose ainsi principalement sur l'analyse du profil multimérique du VWF obtenu après électrophorèse en SDS-agarose [86,87]. La réalisation systématique d'une électrophorèse est ainsi recommandée en cas de forte suspicion de VWD acquise [87].

## 5. Traitement

La prise en charge des manifestations hémorragiques secondaires à la VWD constitutionnelle repose sur différents traitements hémostatiques dont l'indication varie en fonction du type de VWD, des comorbidités du patient, de la durée prévisible du traitement substitutif et de la sévérité des manifestations hémorragiques : hémostatiques locaux, traitements hormonaux, anti-fibrinolytiques, desmopressine, transfusion plaquettaire, concentrés de facteur Willebrand purifié d'origine plasmatique, concentrés de facteur VIII d'origine plasmatique ou recombinante. Les concentrés de VWF et/ou de FVIII sont administrés le plus souvent soit « à la demande » en cas d'hémorragies spontanées, soit en « prophylaxie primaire » lors d'un acte chirurgical.

Plus rarement, une prophylaxie secondaire par concentrés de VWF peut être indiquée en cas d'épisodes hémorragiques sévères ou récidivants. Plusieurs études rétrospectives monocentriques ont reporté, essentiellement dans la VWD de type 3, une efficacité de la prophylaxie secondaire sur les hémarthroses, les épistaxis ou les ménorragies sévères <sup>[95-97]</sup>. L'efficacité de cette approche dans la prévention secondaire des hémorragies digestives est variable selon les études en lien probablement avec le schéma de prophylaxie retenu (posologie & fréquence hebdomadaire des injections). Il semble ainsi que la prophylaxie des hémorragies digestives par concentrés de VWF nécessite des posologies plus élevées que celles permettant le contrôle des hémarthroses, ménorragies ou épistaxis. Une étude prospective internationale multicentrique (VWD International Prophylaxis VIP Study, NCT00557908) est en cours pour confirmer ces données.

Les principes de traitement sont identiques dans la VWD acquise mais le traitement de l'étiologie sous-jacente est bien entendu indispensable pour espérer obtenir une rémission à

long terme de la symptomatologie hémorragique. Concernant le traitement à visée hémostatique, les options thérapeutiques pour le traitement ou la prévention des épisodes hémorragiques sont plus limitées que dans la VWD constitutionnelle.

### **III. VWD acquise au cours des cardiopathies à forces de cisaillement élevées**

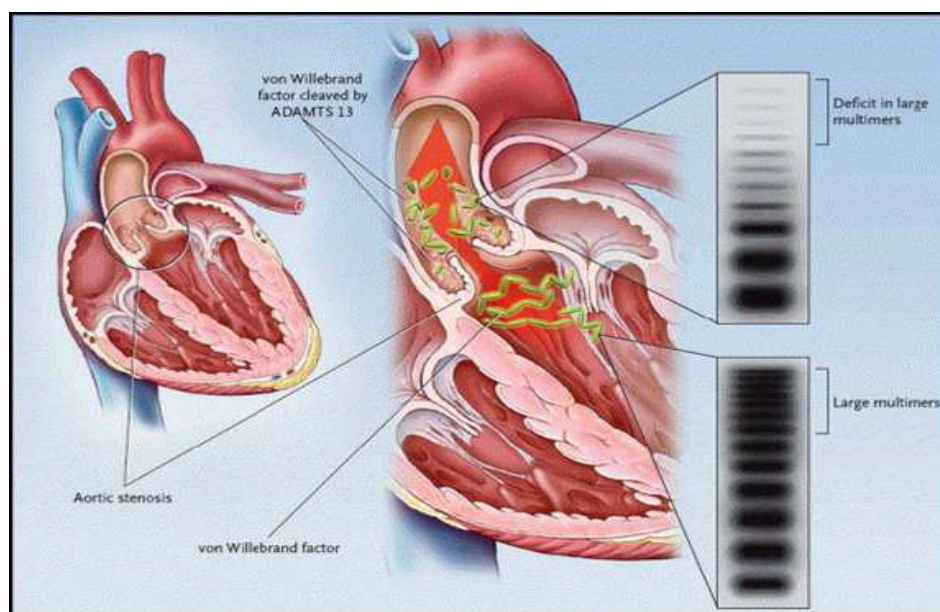
#### **1. VWD acquise et rétrécissement aortique**

Le rétrécissement aortique (Rao) est la valvulopathie cardiaque la plus fréquente avec une prévalence dans les pays occidentaux qui devrait nettement augmenter ces prochaines années avec le vieillissement de la population. Une méta-analyse récente montre que le Rao et le Rao sévère concernent respectivement 12.4% et 3.4% des occidentaux de plus de 75 ans <sup>[98]</sup>. L'évolution spontanée du Rao est caractérisée par une période de latence où cette valvulopathie est asymptomatique. L'apparition de symptômes à l'effort (angor, dyspnée, syncopes ou lipothymies) marque un tournant évolutif sur le plan pronostique et constitue une indication de remplacement valvulaire aortique (RVAo).

Une association entre hémorragies digestives liées à des angiodysplasies et le Rao a été décrite par Mr Heyde dès les années cinquante sans lien physiopathologique alors évident. La prévalence du syndrome de Heyde dans le Rao serait de l'ordre de 2 à 3% <sup>[99]</sup>. Ces saignements digestifs régressent classiquement après la chirurgie de RVAo <sup>[100, 101]</sup> alors que la résection digestive n'est efficace que dans 10% des cas <sup>[101]</sup>. En 1992, l'hypothèse d'une VWD acquise faisant le lien entre hémorragies gastro-intestinales liées à des angiodysplasies et Rao est soulevée <sup>[102]</sup>. Cette hypothèse est confortée secondairement suite à la mise en évidence d'une prévalence élevée d'angiodysplasies et d'anomalies de multimérisation du VWF chez les patients atteints d'un Rao <sup>[103]</sup> et la disparition de ces lésions après remplacement valvulaire chirurgical <sup>[104]</sup>. Le constat d'une augmentation des fragments de protéolyse du VWF en présence d'un Rao sévère suivie de leur diminution six mois après chirurgie valvulaire, suggère alors l'intervention d'une protéase plasmatique clivant les VWF-HPM au sein de leur domaine A2 <sup>[105]</sup>. Après la purification et le clonage de l'ADAMTS13 en



2001, une protéolyse excessive du VWF par l'ADAMTS13 apparaît comme le principal mécanisme candidat au déficit acquis en VWF observé dans le Rao. Cette hypothèse est confortée ultérieurement par l'étude systématique chez des patients présentant un Rao de la relation entre l'intensité des des forces de cisaillement et l'importance du déficit en VWF-HPM. Ce travail révèle que le pourcentage résiduel de VWF-HPM est inversement corrélé à l'intensité du gradient trans-aortique. Il confirme ainsi le rôle causal des forces de cisaillement élevées générées par le Rao dans la perte des VWF-HPM établissant ainsi le chaînon manquant entre ADAMTS13 et protéolyse des VWF-HPM <sup>[83]</sup> (**Figure 12**).



**Figure 12: Physiopathologie de la dégradation des multimères de haut poids moléculaire du VWF en présence d'un rétrécissement aortique sévère (d'après Sadler, 2003)**

Ce mécanisme physiopathologique est également vraisemblable dans d'autres cardiopathies susceptibles d'engendrer des forces de cisaillement élevées et chez lesquelles on observe une prévalence élevée d'un déficit en VWF-HPM : insuffisance mitrale <sup>[91]</sup>, cardiomyopathie hypertrophique obstructive avec bourgeon septal <sup>[106]</sup>, canal artériel persistant <sup>[107]</sup> ou valvulopathies congénitales complexes <sup>[108,109]</sup>.

## **2. VWD acquise et assistances circulatoires mécaniques à flux continu**

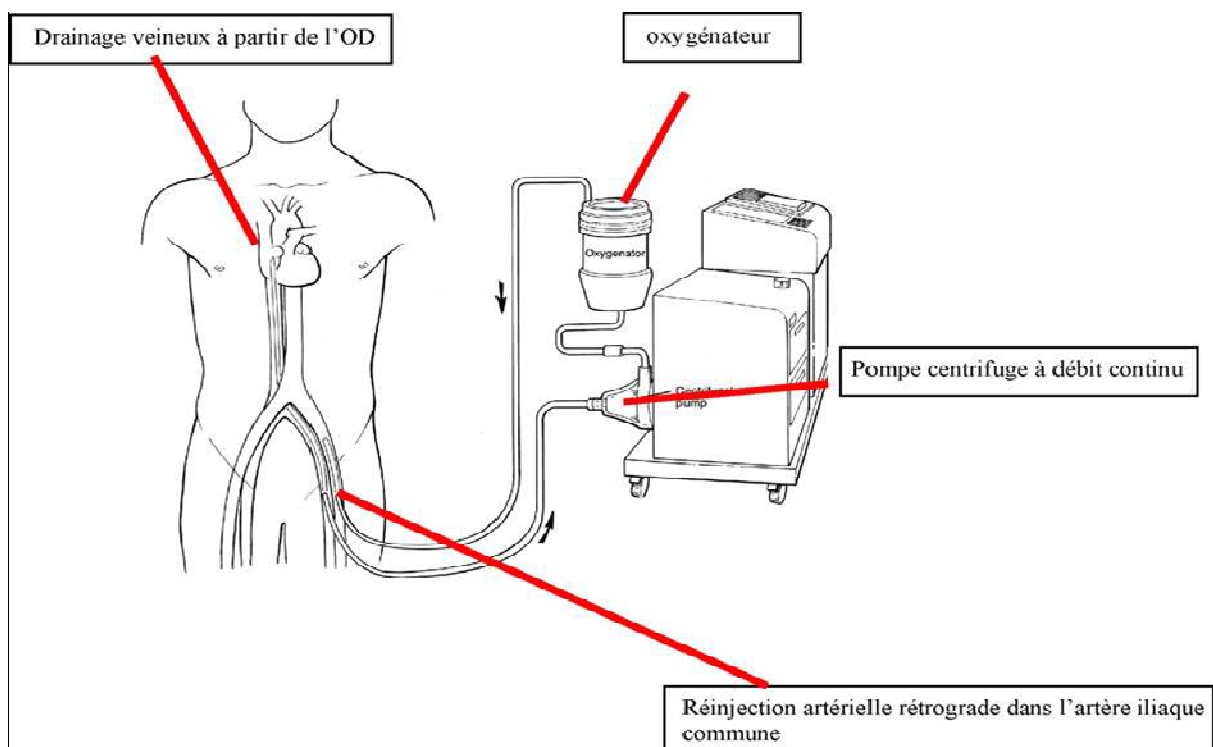
### **a. Historique et indications des assistances circulatoires mécaniques (ACM)**

L'ACM consiste en l'implantation chirurgicale d'une pompe permettant de suppléer les fonctions ventriculaires gauche et/ou droite chez les patients en insuffisance cardiaque terminale. Cette technique a été initialement conçue en vue d'une assistance cardiaque temporaire pour certaines cardiopathies aiguës susceptibles d'une rapide récupération spontanée (myocardites virales, bas débit post-CEC) (« bridge to recovery »), ou pour des patients en insuffisance cardiaque terminale en attente d'une transplantation cardiaque (« bridge to transplantation »). Les dispositifs d'assistances circulatoires diffèrent selon : 1) leur localisation extra- ou intra-corporelle, 2) leur mode d'implantation (abord vasculaire, implantation chirurgicale hétérotopique ou orthotopique pour les cœurs artificiels), 3) leur principe de fonctionnement (pneumatique ou électrique) 4) le type d'assistance mono- ou bi-ventriculaire (l'assistance ventriculaire gauche est placée entre le ventricule gauche et l'aorte alors que l'assistance bi-ventriculaire est placée entre le ventricule gauche et l'aorte ainsi qu'entre l'oreillette droite et l'artère pulmonaire).

Schématiquement, il existe deux types de dispositifs permettant une assistance ventriculaire prolongée : les dispositifs de 1<sup>ère</sup> génération permettant un support mono- ou bi-ventriculaire et induisant un débit pulsatile (ventricules pneumatiques paracorporels et ventricules électriques implantables ; ACM à flux pulsatile) et ceux de 2<sup>e</sup> génération permettant un support mono-ventriculaire et induisant un débit continu (pompes électriques rotatives axiales ou centrifuges, ACM à flux continu) (**Table 3, Figure 13**). Les dispositifs permettant une assistance ventriculaire de courte durée reposent actuellement sur des pompes électriques à flux continu ou sur l'ECMO veino-artérielle (Extra Corporeal Life Support, ECLS) (**Table 4, Figure 14**). Les cœurs artificiels sont implantés en lieu et place des ventricules ou du cœur natif et ont un fonctionnement pulsatile (**Table 5**).



**Figure 13: Assistance ventriculaire gauche par pompe rotative à flux continu HeartMateII**



**Figure 14: ECMO veino-artérielle périphérique fémoro-fémorale.**

		Dispositifs d'ACM	Type support	Débit	Indication	AVWS
<b>Ventricules pneumatiques para-corporels</b>	1 <sup>ère</sup> génération	Thoratec® PVAD	MonoV ou BiV	Pulsatile	+/-	oui (BiV)
		Abiomed BVS 5000®				?
		Medos®			Pédiatrie	?
		BerlinHeart Excor®				oui
<b>Ventricules pneumatiques intra-corporels</b>		Thoratec IVAD	+		?	
		HeartMate IP			+	?
<b>Ventricules électriques intra-corporels</b>		HeartMAte XVE®	MonoV		+	Non
		Novacor®			+	?
	LionHeart®	+		?		
<b>Pompes électro-mécaniques</b>	2 <sup>e</sup> génération	<b>Thoratec HeartMate II®</b>	MonoV	Continu	+++	oui
		De Bakey®			+/-	?
		Jarvik 2000®			+/-	oui
		CircuLite®			+/-	oui
		<b>HeartWare®</b>			+++	oui
<b>Pompes électro-magnétiques</b>	3 <sup>e</sup> génération	LVAD Incor®	MonoV	Continu	A venir	?
		DuraHeart LVAS®				
		HeartMate III®				
		Ventrassist®				

**Table 3 : classification des ACM de longue durée (liste non exhaustive)**

Les ACM de 1<sup>ère</sup> génération comportent les ventricules pneumatiques para-corporels et les ventricules électriques implantables (dispositifs à débit pulsatile). Les ACM de 2<sup>e</sup> génération comportent les pompes électriques rotatives axiales et centrifuges (dispositifs à débit continu)

	Dispositifs	Type support	Débit	Indications	AVWS
Pompes rotatives périphériques	Impella 2.5®	MonoV	Continu	BTR/BTD	Oui
	TandemHeart®	(VG+++)			?
	Levitronix CentriMag	MonoV ou BiV			Oui
ECMO	ECMO veino-artérielle (ECLS)	Oui			

**Table 4 : ACM de courte durée.** Différentes pompes rotatives à flux continu peuvent être implantées pour une assistance circulatoire mécanique transitoire dans l'attente d'une récupération d'une insuffisance ventriculaire gauche aiguë (« Bridge to recovery » ; BTR) ou comme solution d'attente (« Bridge to decision ; BTD) avant une décision thérapeutique définitive (transplantation cardiaque, implantation d'une ACM-FC à demeure, arrêt des soins). L'ECMO veino-artérielle une alternative à ces pompes pour une ACM de courte durée.

	Dispositifs	Débit	AMM	AVWS
Cœurs artificiels pneumatiques	Cardiowest ou SynCardia TAH	pulsatile	BTT (France)	Non*
Cœur artificiels électromécaniques	Abiocor	pulsatile	BTT (Etats-Unis)	?
	Carmat	pulsatile	DT, Essai clinique	?

**Table 5 : ACM par cœurs artificiels.** Les cœurs artificiels sont implantés à la place du cœur natif soit transitoirement (en vue d'une transplantation cardiaque secondaire, BTT), soit définitivement (DT) selon le dispositif. Les cœurs artificiels actuellement disponibles ou en cours d'essais cliniques sont caractérisés par un débit pulsatile.

Les indications de l'ACM de longue durée se sont considérablement élargies ces dix dernières années suite à l'avènement des dispositifs d'assistance mono-ventriculaire à flux continu. Cette 2<sup>e</sup> génération de pompes a permis une nette amélioration du pronostic et de la qualité de vie des patients nécessitant une ACM prolongée avec une autonomie et une miniaturisation compatibles avec un retour au domicile. Deux études princeps ont rapidement confirmé la supériorité des assistances mono-ventriculaires à flux continu de type HeartMate-II® (HM-II®) sur la génération antérieure d'assistances ventriculaires à flux pulsatile aussi bien chez les patients en attente de transplantation <sup>[110]</sup> que dans le cadre d'une implantation à demeure <sup>[111]</sup>. Le pronostic des patients inéligibles à la transplantation cardiaque s'est vu transformé avec l'avènement de l'ACM-FC avec 74% de patients en vie un an après l'implantation d'un HM-II® versus une survie spontanée inférieure à 40% sous traitement médical. Ce dispositif d'ACM-FC a ainsi rapidement obtenu l'AMM en 2010 pour une implantation à demeure chez les patients en insuffisance cardiaque terminale inéligibles à la transplantation (« destination therapy »).

Cependant, l'évolution des patients sous ACM-FC est caractérisée par une prévalence élevée d'épisodes hémorragiques et thrombotiques rendant leur prise en charge particulièrement complexe, et ce d'autant plus qu'une anticoagulation curative (associée selon les centres à une anti-agrégation plaquettaire) au long cours reste nécessaire. A niveau d'anticoagulation comparable, la fréquence des hémorragies digestives et des événements thrombotiques semble ainsi significativement plus élevée sous ACM-FC qu'en présence d'une valve aortique mécanique <sup>[112]</sup>.

## **b. Manifestations hémorragiques sous ACM à flux continu**

### *i. Incidence*

Les hémorragies sont une complication fréquente sous ACM-FC et surviennent principalement sur le site opératoire, nécessitant fréquemment une ré-intervention chirurgicale, ou au niveau du tractus digestif. Les études princeps réalisées en vue de l'obtention de l'AMM pour le dispositif d'ACM-FC HM-II® rapportaient ainsi une incidence élevée d'hémorragies chirurgicales et d'hémorragies digestives spontanées <sup>[110, 111]</sup>. Les hémorragies digestives sont rapidement apparues comme une complication caractéristique de l'ACM-FC, avec une incidence dix fois plus élevée sous HM-II® dans les quinze jours suivant l'implantation comparé à la génération antérieure d'ACM à flux pulsatile <sup>[113]</sup>. Une prévalence élevée d'hémorragies digestives tardives (>15<sup>e</sup> jour post-implantation) a ensuite été rapportée chez les patients implantés à demeure <sup>[114, 115]</sup>. Ceci a conduit certains experts à recommander un niveau plus faible d'anticoagulation par anti-vitamines K sous HM-II® <sup>[116]</sup>. Ceci a vraisemblablement contribué à la diminution de la prévalence des hémorragies digestives spontanées qui varie désormais de 19% à 25% selon les études les plus récentes <sup>[92, 117, 118]</sup>. Cependant, les complications hémorragiques demeurent la 1<sup>ère</sup> cause d'hospitalisation pour les patients sous ACM-FC aux USA <sup>[117]</sup>. Elles surviennent pour la majorité dans les 3 mois suivant l'implantation de ces dispositifs selon une incidence bimodale : hémorragies thoraco-médiastinales dans la 1<sup>ère</sup> semaine suivant l'implantation d'un HM-II® par sternotomie, puis hémorragies digestives passant au 1<sup>er</sup> plan avec un pic d'incidence environ un mois après implantation <sup>[118]</sup>.

Les données concernant les patients sous oxygénation membranaire extra-corporelle (ExtraCorporeal Membrane Oxygenation, ECMO), où l'assistance respiratoire (ECMO veino-veineuse) ou circulatoire (ECMO veino-artérielle) repose également sur une pompe à flux continu, sont plus limitées mais il existe également une prévalence élevée d'hémorragies.

L'analyse du registre international ELSO (Extracorporeal Life Support Organization) montre ainsi une prévalence élevée de manifestations hémorragiques au niveau des sites de canulations vasculaires et des territoires cutanéomuqueux (épistaxis, hémorragies digestives, hémorragies bronchiques notamment) [Extracorporeal Life Support Organization. Registry report: international summary. Ann Arbor: ELSO; July 2012]. Une récente méta-analyse portant sur environ 1800 patients reporte une prévalence hémorragique globale de 33% sous ECMO et une prévalence d'hémorragies digestives de 7% <sup>[119]</sup>.

*ii. Pronostic*

Les hémorragies digestives semblent associées à un faible taux de mortalité lors de l'épisode aiguë <sup>[113, 120]</sup>. Cependant, les hémorragies post-opératoires précoces et les hémorragies digestives récurrentes ont été identifiées récemment comme facteurs de risque indépendants de mortalité sous ACM-FC <sup>[118]</sup>.

**c. Syndrome de Willebrand acquis et ACM à flux continu**

La prévalence des manifestations hémorragiques sous ACM-FC est trop élevée pour être attribuable aux seuls traitements anticoagulants (anti-vitamines K) et/ou antiagrégants plaquettaires (aspirine et/ou dypiridamole). La prévalence des hémorragies digestives sous ACM-FC serait ainsi supérieure à la prévalence hémorragique globale sous traitement combiné par antiagrégants et anti-vitamines K pour une valve cardiaque mécanique <sup>[113]</sup>. Par ailleurs, un INR supra-thérapeutique n'est pas prédictible de la sévérité du syndrome hémorragique sous ACM-FC <sup>[84, 118]</sup>. Ceci suggère l'existence de mécanismes additionnels dans la survenue des manifestations hémorragiques sous ACM-FC.

L'hypothèse d'un syndrome de Willebrand acquis s'est rapidement imposée sur la base d'arguments biologiques et cliniques. En effet, alors qu'une dégradation des VWF-HPM



survient systématiquement sous ACM-FC, ce phénomène semble rarement observé sous ACM à flux pulsatile <sup>[121]</sup>. Cette dégradation des VWF-HPM sous ACM-FC est observée aussi bien avec les pompes rotatives type HM-II® <sup>[84, 122, 123]</sup>, que centrifuges type HeartWare® <sup>[124]</sup> (**Table 3**). Une dégradation des VWF-HPM est également rapportée sous assistance circulatoire percutanée de type Impella® <sup>[125]</sup> ou sous ECMO veino-artérielle <sup>[126, 127]</sup>, dispositifs reposant sur une pompe à flux continu (**Table 4**).

La perte des VWF-HPM intervient précocement après implantation d'une ACM-FC <sup>[128]</sup> et est réversible après sevrage de l'ACM-FC ou après transplantation cardiaque <sup>[84, 129]</sup>. Cette dégradation des VWF-HPM a été reproduite *ex-vivo* <sup>[130]</sup> et dans des modèles animaux d'ACM-FC <sup>[131]</sup>. Cliniquement, une incidence anormalement élevée d'hémorragies digestives sur angiodysplasies est rapportée en présence de valvulopathies comme l'insuffisance mitrale <sup>[91]</sup> ou le Rao <sup>[83]</sup>, conditions également associées à une perte des VWF-HPM. Une physiopathologie similaire à celle du Rao (excès de protéolyse) semble en cause dans la perte des VWF-HPM observées avec les dispositifs actuels d'ACM-FC. L'intensité de la dégradation des VWF-HPM chez les patients sous pompe centrifuge à flux continu Heartware® est en effet corrélée à la vitesse de la pompe d'assistance <sup>[124]</sup>, suggérant un rôle causal des forces de cisaillement par analogie à ce qui est reporté dans le Rao <sup>[83]</sup>. Cette perte des VWF-HPM s'accompagne par ailleurs d'une augmentation parallèle des multimères de bas poids moléculaires et des bandes satellites compatible avec un clivage du VWF par l'ADAMTS13 <sup>[93]</sup>.

### **3. Diagnostic**

Le bilan de dépistage classique de la VWD, reposant sur un dosage conjoint du FVIII, du VWF:Ag et du VWF:RCO, est régulièrement pris à défaut notamment dans le diagnostic des syndromes de Willebrand acquis. Seuls les techniques électrophorétiques semblent ainsi avoir une sensibilité satisfaisante pour le diagnostic des syndromes de Willebrand acquis notamment ceux d'origine cardio-vasculaire <sup>[87]</sup>. Cependant, ces techniques sont chronophages et requièrent une expertise technique importante. Ceci restreint leur disponibilité et limite leur intérêt diagnostique en cas de manifestations hémorragiques sévères nécessitant un traitement à visée hémostatique en urgence.

### **4. Traitement**

#### **a. Traitement et prévention des épisodes hémorragiques**

En cas d'hémorragies digestives sous ACM-FC, l'ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation) recommande :1) un arrêt des traitements anti-agrégants et anticoagulants 2) une endoscopie digestive systématique à la recherche d'une lésion accessible au traitement endoscopique 3) une baisse de la vitesse de la pompe d'assistance concernant les hémorragies digestives récurrentes sur angiodysplasies <sup>[132]</sup>. Il n'existe ainsi pas de recommandations en faveur d'un traitement à visée hémostatique (par injections de concentrés de VWF) ou anti-angiogénique faute d'études spécifiques. Le régime optimal d'anticoagulation sous ACM-FC n'a pas fait l'objet d'essais cliniques. Il n'existe pas de recommandations concernant la prise en charge des syndromes de Willebrand acquis sur valvulopathies cardiaques.

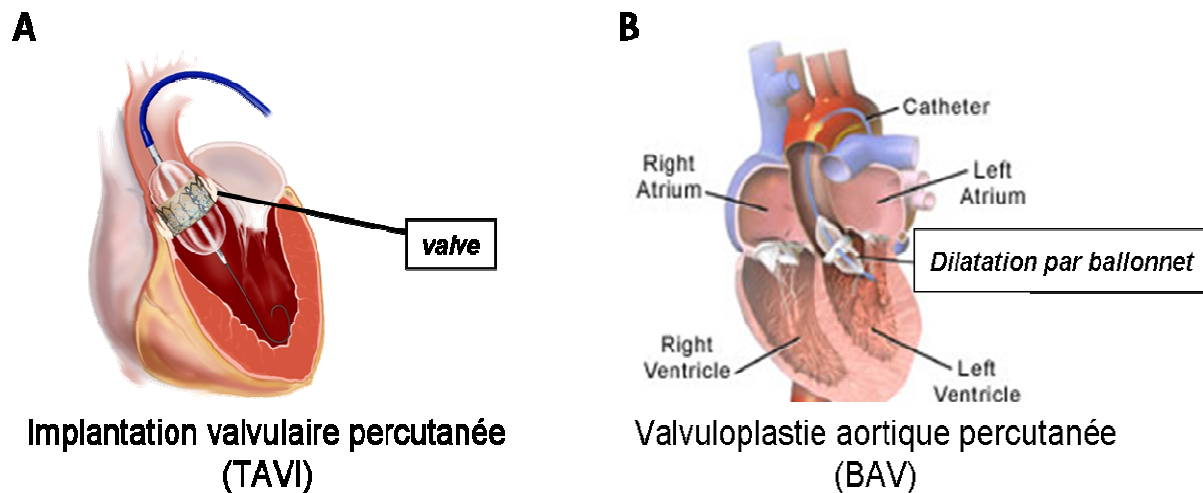
## **b. Traitement de la cardiopathie causale**

### *i. Cas des VWD acquises associées aux valvulopathies*

La prise en charge optimale d'une VWD acquise implique le traitement de l'étiologie causale. Le remplacement valvulaire aortique (RVAo) chirurgical, par implantation d'une valve mécanique ou biologique sous circulation extra-corporelle, permet le plus souvent la restauration des VWF-HPM et le traitement définitif des hémorragies digestives <sup>[89, 104]</sup> en lien avec le rétablissement de conditions hémostatiques normales <sup>[83]</sup>. La cinétique de cette correction du déficit en VWF-HPM n'a pas fait l'objet d'étude spécifique bien qu'elle semble complète 24 heures après un RVAo chirurgical. En cas de persistance d'anomalies rhéologiques au sein de la valve implantée chez les patients porteurs d'un mismatch prothèse-anneau aortique, le déficit en VWF-HPM est susceptible de récidiver à distance de la chirurgie <sup>[83]</sup>. D'après une étude rétrospective de la Mayo clinic, la chirurgie conventionnelle permettrait une éradication du syndrome de Heyde chez 80% des patients opérés <sup>[133]</sup>. De façon analogue, une myomectomie septale semble permettre la correction des hémorragies digestives observées dans un contexte de VWD acquise sur cardiomyopathie hypertrophique avec bourgeon septal <sup>[134]</sup>.

Si le RVAo chirurgical sous CEC demeure l'intervention de référence dans le traitement du Rao sévère, la cardiologie interventionnelle a connu un développement majeur dans cette indication ces dix dernières années. La mise en place d'une bioprothèse valvulaire aortique par voie transcutanée (Transcatheter Aortic Valve Implantation, TAVI) a désormais l'AMM en cas de Rao symptomatique chez un patient inéligible au RVAo chirurgical. Douze ans après sa première implantation <sup>[135]</sup>, on estime que cette intervention a été réalisée chez plus de cinquante mille patients dans le monde. Après un abord le plus souvent au niveau de l'artère fémorale, un cathéter est monté au niveau de la valve aortique en vue de

l'implantation d'une bioprothèse (**Figure 15A**). Deux types de valves sont actuellement implantés: la valve Edwards® dont le déploiement requiert une inflation à l'aide d'un ballon, et la valve CoreValve® auto-expandable. Plusieurs essais cliniques randomisés ont confirmé la supériorité du TAVI au traitement médical et son équivalence au RVAo chirurgical chez des patients Rao à haut risque chirurgical <sup>[136, 137]</sup>. Une étude récente mentionne l'intérêt de la procédure TAVI pour le traitement curatif du syndrome de Heyde secondaire au Rao <sup>[99]</sup>. La valvuloplastie au ballonnet (Balloon Aortic Valvuloplasty, BAV) constitue une alternative à la procédure TAVI dans le traitement du Rao mais cette technique a une efficacité très variable d'un patient à l'autre ce qui limite son indication (**Figure 15B**).



**Figure 15: procédures de cardiologie interventionnelle indiquées dans le traitement du Rao.**

A) implantation valvulaire d'une bio-prothèse par voie percutanée (transcatheter aortic valve implantation, TAVI) B) dilatation percutanée de la sténose valvulaire au moyen d'un ballonnet (valvuloplastie aortique, BAV).

*ii. Cas des VWD acquises associées aux ACM à flux continu*

La VWD acquise associée aux ACM à flux continu (ACM-FC) constitue le plus souvent une impasse thérapeutique. Actuellement, il n'existe pas de traitement hémostatique dont l'efficacité et la sécurité dans cette indication soient validées par des études cliniques. Le sevrage de l'ACM-FC ou le recours à la greffe cardiaque ne concerne qu'une minorité de patients en raison de la pénurie de greffon et de contre-indications fréquentes à la greffe notamment dans l'indication « destination therapy ». Par ailleurs, la nécessité sous ACM-FC d'une anticoagulation curative en prévention primaire d'évènements thrombotiques rend particulièrement complexe la prise en charge de ces patients dont l'évolution est compliquée d'hémorragies sévères notamment digestives.

## **OBJECTIFS DU TRAVAIL**

Les syndromes de Willebrand acquis sur cardiopathies à forces de cisaillement élevées constituent, depuis dix ans environ, une thématique très présente dans l'EA2693. Deux de nos travaux avaient ainsi permis de préciser la prévalence, la physiopathologie et l'évolution des syndromes de Willebrand acquis associés au rétrécissement aortique (Rao) sévère <sup>[83]</sup> et à la cardiomyopathie hypertrophique avec bourgeon septal <sup>[106]</sup>. Nous avons ainsi observé dans le Rao l'existence quasi-systématique d'un déficit en multimères de haut poids moléculaire du VWF (VWF-HPM) et la présence de manifestations hémorragiques cutanéomuqueuses chez environ un quart des patients étudiés, soulignant ainsi la pertinence de l'association faite par Heyde entre Rao et hémorragies digestives dans les années cinquantes. Nous avons également mis en évidence une corrélation inverse entre l'intensité des forces de cisaillement générées par le Rao et le niveau résiduel des VWF-HPM, suggérant un rôle causal de ces anomalies hémorrhéologiques dans la physiopathologie du syndrome de Willebrand acquis. Cette observation rendait concevable l'hypothèse d'une protéolyse des VWF-HPM par l'ADAMTS13 sous l'influence de forces de cisaillement anormalement élevées. De façon notable, nous avons confirmé l'existence d'une physiopathologie similaire dans la cardiomyopathie hypertrophique avec bourgeon septal, avec également un rôle causal des forces de cisaillement dans l'apparition du déficit en VWF-HPM. Enfin, nous avons observé le caractère réversible des anomalies de multimérisation du VWF après RVA chirurgical, excepté en cas de persistance d'anomalies de flux secondaire à un mismatch valve/anneau aortique. Bien que les VWF-HPM soient normalisés dès le lendemain de la chirurgie, nous n'avons cependant pas étudié précisément la cinétique de correction du syndrome de Willebrand acquis *in vivo*.

Dans l'intervalle, l'avènement de l'assistance circulatoire mécanique à flux-continu (ACM-FC) à demeure (« destination therapy ») a remis en perspective de façon aigüe la problématique du traitement curatif du syndrome de Willebrand acquis. La prise en charge du syndrome de Willebrand acquis sous ACM-FC est nettement plus complexe que celui associé au Rao : 1) il n'existe pas de traitement préventif ou curatif des manifestations hémorragiques dont l'efficacité soit démontrée. 2) les patients sous assistance sont à haut risque de thrombose de pompe et d'événements ischémiques d'origine thromboembolique et nécessitent une anticoagulation curative au long cours en prévention primaire. 3) le sevrage de l'assistance ou son relais par la greffe cardiaque permettent la correction du syndrome de Willebrand acquis mais sont rarement envisageables chez ces patients. Cette impasse thérapeutique souligne la nécessité de développer des techniques innovantes de diagnostic et de traitement préventif ou curatif du syndrome de Willebrand acquis sous ACM-FC.

L'évaluation quantitative de la protéolyse du VWF par une méthode analytique compatible avec un diagnostic rapide des VWD constitutionnelles ou acquises associées à un excès de protéolyse du VWF par l'ADAMTS13, apparaît nécessaire. Les méthodes électrophorétiques actuelles ne sont en effet pas adaptées à l'urgence diagnostique et thérapeutique. La disponibilité de ce type de test serait par ailleurs intéressante dans le cadre d'un essai clinique évaluant la corrélation dans ces pathologies entre excès de protéolyse du VWF, intensité du syndrome hémorragique et pronostic.

Au total, les cinétiques précises de l'apparition et de la correction des anomalies de multimérisation du VWF sur cardiopathies à force de cisaillement élevées sont inconnues *in-vivo*, bien que des données *in-vitro* suggèrent leur caractère dynamique<sup>[63]</sup> faisant du VWF un potentiel bio-marqueur d'intérêt clinique dans ces pathologies. Il n'existe pas de traitement spécifique du syndrome de Willebrand acquis secondaire aux ACM-FC. Le diagnostic du



syndrome de Willebrand acquis sur cardiopathies à force de cisaillement élevées est difficile en raison du caractère non spécifique des hémorragies digestives, du caractère méconnu de cette pathologie dans la communauté médicale et des limitations en pratique clinique des techniques électrophorétiques actuelles.

Ce travail de thèse avait ainsi pour objectifs :

- 1) L'étude du VWF comme biomarqueur de cardiopathies à forces de cisaillement élevées et de son intérêt en cardiologie interventionnelle pour l'évaluation en temps réel de la qualité de l'implantation valvulaire (**chapitre 1**).
- 2) La recherche de molécules prévenant la dégradation du VWF sous ACM-FC (**chapitre 2**).
- 3) Le développement d'un test diagnostique rapide ELISA des formes acquises ou constitutionnelles de VWD associées à un excès de protéolyse du VWF (**chapitre 3**).

## **CHAPITRE 1 : Le facteur von Willebrand comme biomarqueur d'anomalies de flux dans les cardiopathies à forces de cisaillements élevées.**

**Publication 1** : Von Willebrand factor as a biological sensor of blood flow in heart disease and interventions.

Van Belle E\*, Rauch A\*, Vincentelli A, Jeanpierre E, Legendre P, Juthier F, Banfi C, Rouse N, Godier A, Caron C, Elkalioubie A, Corseaux D, Dupont A, Zawadzki C, Mouquet F, Chinetti G, Staels B, Goudemand J, Jude B, Lenting PJ, Susen S. (\*Co-auteurs). En révision.

<sup>1</sup>Department of Cardiology, Lille University Hospital; <sup>2</sup>EA 2693, Lille-II-University; <sup>3</sup>Department of Hematology and Transfusion Lille University Hospital, <sup>4</sup>INSERM U770&UMR\_S770, Univ Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre, <sup>5</sup>INSERM UMR 1140, Paris, <sup>6</sup>INSERM UMR 1011, Univ Lille 2, Institut Pasteur de Lille; EGID, France

\*the authors contributed equally to the manuscript

Le traitement des valvulopathies cardiaques par cardiologie interventionnelle a connu un développement majeur ces dix dernières années. La mise en place d'une bioprothèse valvulaire aortique par voie transcathéter (Transcatheter Aortic Valve Implantation, TAVI) est désormais possible chez les patients ayant un rétrécissement aortique (Rao) symptomatique mais inéligibles au remplacement valvulaire chirurgical sous circulation extra-corporelle <sup>[136]</sup>. La qualité de l'implantation valvulaire en TAVI est essentielle sur le plan pronostique mais son évaluation par échographie-doppler trans-thoracique bidimensionnelle ne permet pas toujours une évaluation fiable soulignant l'intérêt de méthodes alternatives.

Un déficit acquis en VWF-HPM est associé au Rao <sup>[83]</sup> et aux assistances circulatoires mécaniques à flux continu (ACM-FC) <sup>[84]</sup>. Ces deux conditions ont un commun l'induction de forces de cisaillement élevées qui favorisent l'élongation et la protéolyse des multimères de haut poids moléculaire du VWF (VWF-HPM) lors de leur passage au sein de la valve sténosée ou de la pompe. Les cinétiques précises d'apparition et de réversion de ces anomalies qualitatives du VWF, respectivement lors de l'initiation d'une ACM-FC ou lors de la correction d'un Rao ne sont pas connues. Bien que les données expérimentales *in-vitro* suggèrent le caractère extrêmement dynamique de telles cinétiques <sup>[63]</sup>, cette notion n'avait pas jusqu'ici fait l'objet d'une étude *in-vivo*.

Nous avons émis l'hypothèse que la multimérisation du VWF évoluait très rapidement dans des conditions caractérisées par de soudaines variations dans l'intensité des forces de cisaillement. Nous avons étudié la cinétique des modifications du profil multimérique du VWF dans trois modèles distincts associés à des variations aiguës des conditions de flux : après induction puis correction d'une sténose de l'aorte ascendante dans un modèle lapin, à l'initiation d'une assistance ventriculaire gauche par une pompe à flux continu HeartMate-II® chez des patients en insuffisance cardiaque terminale et lors d'un remplacement valvulaire

aortique par voie percutané chez des patients avec un Rao sévère. Nous avons également évalué, dans les groupes TAVI et BAV, l'intérêt de la mesure automatisée par le PFA-100® du temps d'occlusion plaquettaire sur cartouche épinéphrine/ADP (PFA-CADP). Nous avons comme hypothèse que ce paramètre très sensible à un déficit fonctionnel en VWF<sup>[94]</sup>, pouvait refléter en temps réel l'évolution cinétique des VWF-HPM.

Nous avons observé chez le lapin une perte significative des VWF-HPM, cinq et trente minutes après l'induction d'une sténose aigüe de l'aorte ascendante. Nous avons mis en évidence une cinétique similaire, *ex-vivo* et *in-vivo*, à l'initiation d'une assistance circulatoire mécanique par HeartMate-II®. Une restauration rapide des VWF-HPM intervient dans le modèle lapin après la levée de la sténose de l'aorte ascendante. Celle-ci est en effet significative cinq minutes après la levée du banding aortique et complète à trente minutes. Une cinétique similaire des VWF-HPM est observée chez l'homme après déploiement d'une bio-prothèse aortique (procédure TAVI), en association avec une correction complète des anomalies de flux. A l'inverse, la dilatation au ballonnet du Rao (procédure BAV) ne s'accompagne que d'une faible restauration des VWF-HPM, en association avec la persistance d'anomalies de flux au niveau de la valve aortique. De façon notable, l'étude du PFA-CADP montre une cinétique superposable à celle des VWF-HPM dans les groupes TAVI et BAV. On observe en effet une normalisation rapide et complète du PFA-CADP chez les patients TAVI contrastant avec une correction modeste chez les patients BAV.

Notre étude souligne un potentiel intérêt du VWF comme bio-marqueur d'anomalies de flux dans les cardiopathies à forces de cisaillement élevées. La mesure du PFA-CADP, sensible à un déficit en VWF-HPM, témoigne en temps réel de la qualité de l'implantation valvulaire au cours de la procédure TAVI.

**Von Willebrand Factor As A Biological Sensor Of Blood Flow To Monitor Percutaneous Aortic Valve Interventions: Insights From The WITAVI Registry**

Eric Van Belle<sup>\*,1,2</sup> MD,PhD; Antoine Rauch<sup>\*,2, 3</sup> MD; André Vincentelli,<sup>1,2</sup> MD,PhD; Emmanuelle Jeanpierre,<sup>2,3</sup>PharmD; Paulette Legendre,<sup>4</sup>; Francis Juthier,<sup>1,2</sup> MD,PhD; Carlo Banfi,<sup>1,2</sup> MD,PhD; Natacha Rousse, MD<sup>1,2</sup>; Anne Godier,<sup>5</sup> MD,PhD; Claudine Caron,<sup>2,3</sup> PharmD; Ahmed Elkalioubie,<sup>2, 3</sup> MD,PhD; Delphine Corseaux,<sup>2</sup>PhD, Annabelle Dupont,<sup>2</sup> PharmD, PhD; Christophe Zawadzki,<sup>2,3</sup>, PharmD,PhD; Cédric Delhayé,<sup>1</sup> MD; Frédéric Mouquet,<sup>1,2</sup>MD,PhD; Giulia Chinetti,<sup>6</sup> PhD; Bart Staels,<sup>6</sup> PhD; Jenny Goudemand,<sup>2,3</sup>MD,PhD; Brigitte Jude,<sup>2,3</sup>MD,PhD; Peter J. Lenting,<sup>4</sup> PhD; Sophie Susen,<sup>2,3</sup> MD,PhD;

<sup>1</sup>Department of Cardiology, Lille University Hospital; <sup>2</sup>EA 2693, Lille-II-University; <sup>3</sup>Department of Hematology and Transfusion Lille University Hospital, <sup>4</sup> INSERM U770&UMR\_S770, Univ Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre, <sup>5</sup> INSERM UMR 1140, Paris, <sup>6</sup> INSERM UMR 1011, Univ Lille 2, Institut Pasteur de Lille; EGID, France

\*the authors contributed equally to the manuscript

**Brief title:** von Willebrand Factor as a sensor of blood flow

## **Abstract**

**Aims:** Percutaneous aortic valve procedures are a major breakthrough in the management of patients with aortic stenosis (AS). In some circumstances their result can still be inadequate while their evaluation in real-time is challenging. We hypothesized that: 1) induction/recovery of high molecular weight (HMW) multimers of von Willebrand factor (VWF) defect, could occur within minutes following acute changes in blood flow, 2) a bedside point-of-care assay (PFA-CADP), reflecting HMW-multimers changes, could be used to monitor percutaneous aortic valve procedures.

**Methods and Results:** We investigated the time course of the induction/recovery of HMW-multimers defects under conditions of instantaneous changes in shear stress in an AS-rabbit model and in patients undergoing implantation of a continuous-flow Left Ventricular Assist Device (LVAD). We further investigated the recovery of HMW-multimers and monitored these changes with PFA-CADP in AS-patients undergoing transcatheter aortic valve implantation (TAVI) or balloon valvuloplasty (BAV).

Experiments in the AS-rabbit model and in LVAD-patients demonstrated that induction/recovery of HMW-multimers occurs within 5 minutes. TAVI-patients experienced an acute decrease in shear stress and a recovery of VWF defects within minutes of implantation. In BAV-patients, a modest improvement in shear stress and no recovery of VWF defects were observed. PFA-CADP profiles mimicked HMW-multimers recovery both in TAVI-patients (correction) and BAV-patients (no correction).

**Conclusion:**

These results demonstrate that variations in VWF multimeric pattern are highly dynamic, occurring within minutes after changes in blood flow. Assessing VWF changes overtime with a point-of-care assay like PFA-CADP could be useful to monitor acute changes in blood flow during BAV and TAVI procedures.

**Key Words:** aortic stenosis, von Willebrand factor, blood flow, left ventricular assist device, transcatheter aortic valve interventions, bedside monitoring

## Introduction

Percutaneous aortic valve procedures, including transcatheter aortic valve implantation (TAVI) and balloon aortic valvuloplasty (BAV), are recent major breakthrough in the management of patients with aortic stenosis (AS)<sup>1,2</sup>. In some circumstances their results can still be inadequate while their evaluation in real-time can also be challenging. Among examples are the cases of balloon valvuloplasty procedures and valve-in-valve TAVI procedures, where an insufficient opening of the valve can still be observed while the recognition of the problem during the procedure may remain difficult<sup>3</sup>.

Acquired deficiency of von Willebrand factor (VWF), characterized by a loss of high molecular weight (HMW) multimers, is associated with cardiovascular disorders in which the entire blood volume is exposed to high shear stress<sup>4-9</sup>. It has been demonstrated that acquired VWF deficiency can be detected within days following implantation of an axial-continuous-flow-Left Ventricular Assist Device (LVAD)<sup>10</sup>. We and others<sup>11,12</sup> also demonstrated that the VWF deficiency present in patients with AS was corrected within days following its surgical treatment. Based on *in-vitro* studies, it was inferred that unfolding and cleavage of the VWF A2 domain *in-vivo* could occur within 200 seconds in response to acute changes in shear conditions<sup>13</sup>. However, the initial time course of loss/recovery of VWF HMW-multimers following acute changes in blood flow *in-vivo* has not yet been studied.

PFA-closure time ADP (CADP) is a highly sensitive way to screen for HMW-multimers defects<sup>14</sup> and has been shown to be prolonged in patients with “high shear-cardiovascular disorders” including those with AS<sup>6,11,15</sup>. As PFA-CADP can be assessed by a small whole blood analyzer (PFA-100®) it has the potential to be used as a bedside monitor of HMW-multimers changes.



We hypothesized that induction/recovery of HMW-multimers defect could occur within minutes of acute changes in blood flow induced by cardiac interventions and we further investigated the potential underlying mechanisms. We also hypothesized that HMW-multimers recovery, as assessed by PFA-CADP, could be used to monitor in real-time the results of transcatheter aortic valve procedures. To evaluate these hypotheses *in-vivo*, we investigated the time course of HMW-multimers loss/recovery in an animal model of reversible aortic stenosis specifically developed for that purpose. We further investigated the time course of HMW-multimers loss/recovery and its related bedside whole blood assessment (PFA-100 analyzer) in 28 patients included in the WITAVI (Willebrand-TAVI) registry and undergoing 1) implantation of an axial-continuous-flow-LVAD (HeartMate-II®, n=8) and 2) transcatheter aortic valve procedures, either BAV (n=10) or TAVI (n=10).

## **Materials and Methods**

### **Instantaneous induction and reversion of high shear stress in a rabbit model of reversible aortic stenosis**

We developed a new rabbit model of instantaneous, reversible, calibrated supra-aortic stenosis, adapted from Assad et al<sup>16</sup> and Godier et al<sup>17</sup> (see supplementary methods for details). This model allowed the evaluation in the same rabbit, of the dynamic time course of loss and recovery of HMW-multimers. In each rabbit (n=17), blood was sampled, before (T0), and after the induction of aortic stenosis (T5, T30). Then the stenosis was reversed 30 minutes after its induction and blood was sampled 5 and 30 minutes after reversion (T35, T60).

### **Patients from WITAVI Registry**

After approval from the local ethics committee, we performed a prospective registry of patients undergoing HeartMate-II® implantation or percutaneous aortic valve intervention, including clinical data collection and blood sampling during the procedure. All patients provided informed written consent and were included in the WITAVI registry.

#### *Induction of high shear stress in patients undergoing implantation of HeartMate-II® LVAD*

HeartMate-II® (Thoratec Corp., Pleasanton, California) is an axial-continuous-flow-LVAD. Its initiation in patients represents a unique clinical situation of nearly instantaneous exposure of blood to high shear stress. A time-course of VWF multimeric analysis was performed *in-vivo* in 8 consecutive patients at the time of initiation of HeartMate-II® support. Samples were collected before (T0) and after initiation of HeartMate-II® support at 9000 rpm (T5, T30 and T180 minutes).

### *Reversion of high shear stress in patients with aortic stenosis undergoing transcatheter aortic valve procedure*

Conversely, the TAVI procedure is associated with a nearly instantaneous normalization of aortic valve area<sup>1,2</sup> and represents a unique clinical situation of instantaneous reversal of pathological high shear, while balloon aortic valvuloplasty (BAV), which consists in a dilatation of the aortic valve without valve replacement, is associated with a modest and inconstant improvement of the aortic valve area<sup>18</sup>. Therefore patients undergoing BAV could be used as a “negative” control in which shear stress doesn’t reverse completely.

A time-course of HMW-multimers analysis and its related whole blood assessment (PFA-CADP) was performed *in-vivo* in 20 patients with severe aortic valve stenosis in stable clinical condition, with a clinical need for either TAVI (n=10) or BAV (n=10) procedures. Both procedures were performed through a percutaneous transfemoral approach according to standard practice while TAVI was performed with the Edwards-Sapien XT device<sup>2,3</sup>. Samples were collected before (T0) and after the procedure (T5, T30 and T180 minutes). Potential improvement in shear stress conditions (transvalvular velocity and gradient) was evaluated by a transthoracic echocardiography performed before and 24 hours after the procedure.

### **Induction of high shear stress *in-vitro* using a HeartMate-II® assist device model**

Using an *in-vitro* HeartMate-II® model, we first investigated the kinetics of HMW-multimers loss and recovery in the absence of endothelium. For each experiment, human blood (either heparinized or citrated) from healthy donors was perfused in a tubing system using a circulatory flowing pump device in which the HeartMate-II® was the pump. Because the results of the experiments performed using heparinized or citrated blood were similar, they

are presented together. The HeartMate-II® rotor was set to high shear (9000 rpm), as achieved in patients implanted with HeartMate-II®, or to low shear (3000 rpm). We further assessed the role of VWF proteolysis as a mechanism underlying the loss of HMW-multimers in this model (see supplementary methods).

### **Laboratory assessment**

VWF antigen (VWF:Ag, Sta Liatest, Diagnostica Stago, Inc.) and VWF propeptide (VWFpp, Lifecodes VWF & Propeptide Assay, Gen-probe®) levels were measured by ELISA. VWF activity was assessed by a latex immunoturbidimetric assay (Innovance® VWF Ac; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany). As our aim was the detection of changes in HMW-multimers we choosed to perform experiments by using gels with low agarose concentrations<sup>19,20</sup>. VWF multimeric analysis was performed as previously described<sup>11</sup>. The results are expressed as a ratio to normal pooled plasma (NP, standard human plasma Siemens healthcare diagnostics, Marburg, Germany). Immunoprecipitation/western blot analysis was performed to measure VWF proteolysis fragments (176 and 140kDa) (see the supplementary method section for details).

PFA-CADP was assessed by platelet-function analyzer PFA-100®, (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) using ADP cartridges (PFA-CADP, normal range=68-121sec) as previously described<sup>11,14</sup>.

VWF:Ag and VWF multimeric analysis were newly developed for rabbits. Loading of the electrophoretic gels was normalized for VWF:Ag content. The results are expressed as relative to baseline values determined for each animal.

## **Statistical analysis**

Data were expressed as means ( $\pm$ SD), unless indicated otherwise. Multiple time comparisons were performed using repeated measures of 1-way ANOVA. When appropriate, time points were compared with a Wilcoxon rank test for paired or Mann Whitney for unpaired groups. P values  $<0.05$  were considered statistically significant.

## **Results**

### **Instantaneous induction and reversion of high shear stress in a rabbit model of reversible aortic stenosis**

In the AS-rabbit model, a significant decrease in HMW-multimers was observed 5 minutes ( $0.76\pm 0.13$ ;  $p<0.01$ ) and further 30 minutes ( $0.74\pm 0.07$ ;  $p<0.01$ ) after stenosis induction when compared to baseline values (Fig 1). Conversely a significant increase in HMW-multimers was already observed 5 minutes after reversal of the stenosis ( $0.89\pm 0.12$ ;  $p<0.01$ ). Thirty minutes after the reversion, a complete recovery of HMW-multimers was observed ( $0.98\pm 0.10$ ) (Fig 1).

### **Rapid loss of HMW-multimers after induction of high shear stress in patients undergoing HeartMate-II® implantation**

The kinetics of HMW-multimers loss in human blood was studied at the time of HeartMate-II® implantation in 8 consecutive patients (6 males and 2 females, aged  $59\pm 12$  years). A significant time-dependent loss of HMW-multimers was observed after initiating the pump (rotor set  $\approx 9,000$  rpm) reaching  $0.86\pm 0.37$ ,  $0.69\pm 0.32$  and  $0.48\pm 0.18$  at 5min, 30min and 180min respectively ( $p<0.01$ , Fig 2C and 2D). A significant time-dependent increase in intermediate (I) plus low (L) MW mirroring the loss of HMW-multimers was observed reaching  $1.11\pm 0.11$  at 180 min compared to  $1.01\pm 0.08$  at baseline ( $p<0.05$ ). Consistent with the loss of HMW-multimers, a time-dependent decrease in VWF:Act/VWF:Ag ratio was also observed reaching  $0.90\pm 0.13$  at 180 min vs  $1.06\pm 0.23$  at baseline ( $p<0.05$ ).

These findings were further investigated in the *in-vitro* HeartMate-II® model. In the *in-vitro* HeartMate-II®-model, when whole human blood was submitted to high shear stress (rotor set at 9,000 rpm), a progressive and time-dependent loss of HMW-multimers was also observed. The loss of HMW-multimers was more pronounced after 5 minutes than in LVAD-patients and was complete after 180 min ( $p<0.0001$ ; Fig 2A and B). The role of VWF-proteolysis was verified by: 1) a time-dependent increase in specific VWF proteolytic fragments (140 and 176kDa) in patients (Suppl Fig 1A), and 2) an absence of time-dependent loss of HMW-multimers when spiking EDTA before pump initiation *in-vitro* (suppl Fig 1B). The shear-dependency of HMW-multimers loss was also verified by setting the rotor of HeartMate-II® at 3,000 rpm (Suppl Fig 1C).

A potential role of acute endothelial release of VWF in attenuating the loss of HMW-multimers observed in patients was evaluated by measuring VWFpp. *In-vitro*, as expected, no change in VWFpp was observed overtime ( $89\pm 27$  at 180 min vs  $89\pm 32$  at baseline, ns). In patients, a time-dependent increase in VWFpp was observed. This VWFpp increase, already significant 5 minutes after initiating the pump ( $528\pm 184$ UI/dL vs  $259\pm 139$ UI/dL at baseline,  $p=0.01$ ), was still apparent after 30 minutes ( $538\pm 139$ UI/dL) and 180 minutes ( $560\pm 140$ UI/dL).

### **HMW-multimers increase rapidly after reversion of pathological high shear stress in patients undergoing TAVI procedure**

The effect of the reversion of high shear on the VWF multimeric pattern was studied in 20 patients with AS requiring to undergo either BAV ( $n=10$ ; 5 males and 5 females; aged  $82\pm 6$  years, LVEF= $53\pm 10\%$ ) or TAVI ( $n=10$ ; 6 males and 4 females; aged  $84\pm 5$  years,

LVEF=55±13%). All patients had NYHA class 3 or 4 and no patient had decompensated heart failure. Reversion was further studied in the *in vitro* HeartMate-II® assist device model which represents the correction of high shear in a model without endothelium. As expected, in patients with AS a HMW-multimers defect was observed at baseline (0.50±0.18 compared to NP), whereas increased levels of IMW+LMW multimers (1.08±0.04) were present.

In patients treated with TAVI, the procedure resulted in a near normalization of shear forces (max transvalvular velocity from 4.47±0.41 m.s<sup>-1</sup> at baseline to 1.81±0.43 m.s<sup>-1</sup> after valve replacement; p<0.001) inducing a marked reduction in mean transvalvular gradient (53.0±9.2 mmHg to 7.6±3.1 mmHg; p<0.001, Fig.3). Those treated with BAV experienced a modest improvement in shear conditions (max transvalvular velocity from 4.47±0.25m.s<sup>-1</sup> at baseline to 3.88±0.65m.s<sup>-1</sup> after BAV; p<0.05) and, as a consequence, a modest decrease in mean transvalvular gradient (49.6±3.8 mmHg to 35.6±13.4 mmHg; p<0.05, Fig.3).

In patients undergoing TAVI, the amount of HMW-multimers nearly doubled at 5 minutes after valve implantation (0.87±0.24, p=0.02), and an almost complete recovery was observed after 180 min (p<0.0001; Fig 4A and 4B). Together with the HMW-multimers recovery, a significant time-dependent decrease of IMW+LMW multimers already significant at 5 min (1.03±0.05) and peaking at 180 min (0.98±0.05) was observed (p<0.01). A time-dependent correction of VWF:Act/VWF:Ag ratio was also observed (from 0.85±0.13 at baseline to 1.08±0.21 at 180min, p<0.05).

BAV procedures did not increase significantly the amount of HMW-multimers (0.58±0.2, 0.66±0.25, 0.64±0.15, at 5, 30 and 180 minutes after BAV respectively; p=0.21; Fig 4C and 4D). No significant time-dependent changes in IMW+LMW multimers nor in VWF:Act/VWF:Ag ratio were observed.



Additional experiments were used to understand the role of the vascular endothelium in the reversion process using the *in-vitro* HeartMate-II® model. Reversion was further studied in the *in-vitro* HeartMate-II® assist device model which represents the correction of high shear in a model without endothelium. High shear was induced for 3 hours (9,000rpm), then the blood flow was submitted to low shear (by switching the speed from 9,000 rpm to 3,000 rpm) for the next 3 hours, mimicking reversal of pathological high shear. As expected in the absence of endothelium, no recovery of HMW-multimers was observed in this model (Suppl Fig 2).

A potential role of the vascular endothelium in the HMW-multimers recovery was also evaluated by measuring the VWFpp levels during TAVI and BAV procedures. In TAVI procedures, VWFpp significantly increased 5 minutes after valve implantation ( $195\pm 63$ UI/dL), and further after 30 ( $215\pm 100$ UI/dL) and 180 minutes ( $429\pm 195$ UI/dL;  $p<0.01$ ) when compared to baseline ( $168\pm 71$ UI/dL). In BAV procedures, VWFpp did not increase significantly overtime ( $275\pm 136$ UI/dL at 180 min vs  $199\pm 107$ UI/dL at baseline, ns).

### **Real-time monitoring of HMW-multimers recovery by PFA-CADP in percutaneous aortic valve procedures**

As expected and mimicking the VWF multimeric profile, characterized by reduced HMW-multimers, PFA-CADP was prolonged in AS-patients ( $252\pm 68$ sec). In TAVI-patients, a time-dependent correction of PFA-CADP was observed ( $193\pm 51$ sec,  $116\pm 40$ sec and  $94\pm 26$ sec at 5, 30 and 180 min respectively,  $p<0.0001$ , Fig 5). By contrast, in BAV-patients no significant change in PFA-CADP was observed overtime ( $212\pm 61$ ,  $204\pm 71$ ,  $219\pm 76$  at 5, 30 and 180 min,  $p=0.69$ , Fig 5).

## **Discussion**

The present study, performed in three clinical conditions and one animal model in which the entire blood volume is exposed to high shear stress, demonstrates that acute changes in blood flow are associated with highly dynamic consequences on the VWF multimeric profile, occurring within minutes. It demonstrates the key roles of HMW-multimers proteolysis and VWF multimers release by the vascular endothelium in those acute changes of VWF-multimeric profile. It further demonstrates that bedside whole blood assessment (PFA-CADP), reflecting HMW-multimers changes, could be used in clinical practice to monitor in real-time the quality of the results of percutaneous aortic valve procedures. Altogether these results provide the first integrated demonstration that VWF can be considered as a biological sensor of blood flow *in-vivo*.

### **Dynamic variations in HMW-multimers in response to acute changes in blood flow**

The present study is the first one to demonstrate that variations in VWF-multimeric profile in response to acute changes in blood flow *in-vivo* are highly dynamic.

While it has been demonstrated that the loss of HMW-multimers could be observed the day after the initiation of LVAD support<sup>10</sup>, the initial response of VWF-multimers following induction of high-shear *in-vivo* was unknown. The dynamic onset of shear-induced proteolysis of HMW-multimers has been extensively described *in-vitro*<sup>13,19,21</sup>. Hence, when subjecting VWF to high shear forces, unfolding of large VWF multimers has been shown to occur in less than 1s *in-vitro* and VWF cleavage was inferred to be effective within 200 seconds *in-vivo*<sup>13</sup>. The present study confirms that the loss of HMW-multimers follows a similar time frame *in-vivo*, and occurs almost immediately after the induction of high shear

stress. Indeed a significant decrease in HMW-multimers was observed 5 minutes after induction of high shear, both in rabbits submitted to an acute AS and after initiation of HeartMate-II® support at high speed (9,000 rpm). Additional experiments performed in the HeartMate-II®-LVAD model further confirmed the shear-dependency of HMW-multimers loss; a rapid loss of HMW-multimers was observed at high speed (9,000 rpm), while no loss was observed at low speed (3,000 rpm).

While HMW-multimers recovery has been observed within days after aortic valve surgical replacement in AS-patients<sup>11,12</sup>, no information was available on the initial phase of correction of AS. A major finding of this study is to demonstrate a nearly immediate recovery of the HMW-multimers upon reversion of the high-shear conditions while no recovery was observed in the absence of correction. In the rabbit model and in AS-patients undergoing TAVI, HMW-multimers recovery was observed 5 minutes after correction of aortic stenosis. In AS-patients undergoing BAV and in whom only a weak reduction in shear forces was achieved, no consistent HMW-multimers recovery was observed.

### **HMW-multimers proteolysis as a shear-dependent process**

VWF shear-induced proteolysis is considered the main mechanism underlying the acquired HMW-multimers defect observed in “high-shear cardiovascular conditions”, such as aortic stenosis or continuous-axial-flow-LVAD support<sup>4,22</sup>. The present study provides new experimental evidence that proteolysis links the induction of high shear to the nearly immediate loss of HMW-multimers. First, in the HeartMate-II®-LVAD patients, the loss of HMW-multimers was associated with an increase in VWF proteolytic fragments. Second, the loss of HMW-multimers at initiation of high shear conditions was blunted when a protease inhibitor (EDTA) was added to the *in-vitro* device model. Finally, the increase in IMW and

LMW multimers as seen in HeartMate-II®-LVAD-patients and the decrease of IMW and LMW multimers seen in TAVI-patients are also consistent with this hypothesis. Altogether these results further re-enforce that shear-induced proteolysis is the major mechanism underlying the acquired HMW-multimers loss observed in “high-shear-cardiovascular disorders”.

### **Vascular endothelium and recovery of HMW-multimers defect**

The inhibition of HMW-multimers proteolysis is not sufficient to explain alone their sudden rise in TAVI patients, unless new VWF molecules circulate in the blood. This question was investigated by measuring VWFpp, which reflects the rate of endothelial VWF release at steady-state conditions<sup>23</sup>. In patients undergoing TAVI, an increase in VWFpp, indicative of an acute release of VWF by the vascular endothelium, was observed. This demonstrates that in combination with the acute inhibition of HMW-multimers proteolysis, an acute release of VWF multimers is providing the requested condition for the acute recovery of the HMW-multimers defect.

Recent studies have demonstrated that an increase in the arterial luminal pressure is able to induce an acute release of VWF by the vascular endothelium<sup>24</sup>. In our study, the observations of a sudden rise in VWFpp in situations where an increase of arterial luminal pressure is observed (such as TAVI- or HeartMate-II®-LVAD patients), and the lack of VWFpp increase in a model without endothelium (such as the HeartMate-II®-LVAD model), is consistent with this hypothesis.

Altogether this suggest that in TAVI-patients, the newly provided multimers, in response to the increased arterial luminal pressure, are no longer submitted to local abnormal high shear

and proteolysis when passing through the valve, thus resulting in an ultimate increase in the proportion of HMW-multimers (Fig 6).

### **PFA-CADP to monitor in real-time the result of aortic percutaneous interventions**

Per-procedural evaluation of the result of aortic percutaneous interventions, an important time as corrective measures can still be undertaken, remains a challenging issue. There is therefore a critical need for a quick and reliable method of evaluation of the results of these interventions.

PFA-100®, which is a whole blood functional test of primary haemostasis, has been shown to be highly sensitive to HMW-multimers defects<sup>14</sup>. A major finding is that a rapid correction in PFA-CADP, reflecting HMW-multimers recovery, was observed in patients undergoing TAVI, while no significant change was observed in those undergoing BAV. This demonstrates that PFA-100 can reflect in “real-time” acute shear modification and evaluate the quality of the results of transcatheter aortic valve procedures.

PFA-CADP could therefore be used to monitor such procedures in some critical circumstances. While BAV is a useful procedure, it is associated with a highly variable improvement in aortic valve area. The use of a larger balloon may provide further enlargement of the aortic valve at the risk of severe aortic regurgitation. Such choice is further complicated as the benefit of BAV is difficult to evaluate accurately during the procedure<sup>3</sup>. In such a case the lack of improvement of PFA-CADP in the catheterization laboratory could provide additional informations and guide the medical decisions to use a larger valvuloplasty balloon. Similarly, while TAVI is often performed in patients with a degenerated biological prosthesis in the so-called Valve-in-Valve procedure, the result can be hampered by the high

residual transvalvular gradient due to a prosthesis/prosthesis mismatch. The development of a broader size choice and fully retrievable devices will provide the opportunity to adapt the initial choice during the procedure pending that prosthesis/prosthesis mismatch can be accurately and quickly recognized. In this situation also, the lack of improvement of PFA-CADP could help the medical decision while the patient is still in the catheterization laboratory.

### **Study limitations**

The number of patients included in this study could be considered as limited. This was largely a consequence of the translational approach of our study and of our goal to provide a real-time assessment of the processes involved. We believe that such an approach favouring multiple “clinical situations” and the assessment of multiple time-points in each “clinical situation” rather than a high number of subjects in each “clinical situation” was more adapted to our research. It did not preclude the detection of significant differences, while the findings obtained in one situation allowed further validation of the findings from another.

While the rabbit model allowed us to investigate onset/offset of loss of HMW-multimers, the underlying mechanisms could not be investigated in the same model due to the lack of specific reagents for rabbits. However, these mechanisms were investigated using the HeartMate-II®-LVAD model and in patients undergoing transcatheter aortic valve procedures.

The use of multimeric analysis of VWF as a biomarker of blood flow is potentially limited by the fact that it is a time-consuming technique. This issue was offset, however, by the use of a point of care PFA-CADP assay which renders our observation clinically relevant.

### **Clinical perspective: VWF as a biological sensor of blood flow**

Although this was previously speculated based on *in-vitro* findings<sup>13</sup>, our results provides the first integrated demonstration that circulating VWF acts as a biological mechanosensor and a dynamic marker of changes in blood flow *in-vivo*. This observation, together with the recently described<sup>25</sup> pleiotropic function of VWF suggests a key role of VWF as a biological transducer of changes in blood flow.

In addition, the mechanosensor property of VWF, as assessed with a point of care assay, could be useful in clinical practice to monitor acute changes in blood flow (e.g during procedures such as BAV and TAVI), and to assist the therapeutical decision in critical circumstances.

**Fundings:** This work was supported by Lille-II University

**Conflict of Interest:** none declared

### **References**

1. Leon MB, Smith CR, Mack M, et al. Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *The New England journal of medicine* 2010;363:1597-607.
2. Van Belle E, Juthier F, Susen S, et al. Postprocedural aortic regurgitation in balloon-expandable and self-expandable transcatheter aortic valve replacement procedures: analysis of predictors and impact on long-term mortality: insights from the FRANCE2 Registry. *Circulation* 2014;129:1415-27.
3. Khawaja MZ, Sohal M, Valli H, et al. Standalone balloon aortic valvuloplasty: indications and outcomes from the UK in the transcatheter valve era. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2013;81:366-73.

4. Loscalzo J. From clinical observation to mechanism--Heyde's syndrome. *The New England journal of medicine* 2012;367:1954-6.
5. Geisen U, Heilmann C, Beyersdorf F, et al. Non-surgical bleeding in patients with ventricular assist devices could be explained by acquired von Willebrand disease. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2008;33:679-84.
6. Le Tourneau T, Susen S, Caron C, et al. Functional impairment of von Willebrand factor in hypertrophic cardiomyopathy: relation to rest and exercise obstruction. *Circulation* 2008;118:1550-7.
7. Meyer AL, Malehsa D, Bara C, et al. Acquired von Willebrand syndrome in patients with an axial flow left ventricular assist device. *Circ Heart Fail* 2010;3:675-81.
8. Uriel N, Pak SW, Jorde UP, et al. Acquired von Willebrand syndrome after continuous-flow mechanical device support contributes to a high prevalence of bleeding during long-term support and at the time of transplantation. *Journal of the American College of Cardiology* 2010;56:1207-13.
9. Federici AB, Rand JH, Bucciarelli P, et al. Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry. *Thromb Haemost* 2000;84:345-9.
10. Heilmann C, Geisen U, Beyersdorf F, et al. Acquired Von Willebrand syndrome is an early-onset problem in ventricular assist device patients. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2011;40:1328-33; discussion 233.
11. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, et al. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *The New England journal of medicine* 2003;349:343-9.
12. Solomon C, Budde U, Schneppenheim S, et al. Acquired type 2A von Willebrand syndrome caused by aortic valve disease corrects during valve surgery. *British journal of anaesthesia* 2011;106:494-500.
13. Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, Wong WP, Springer TA. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science* 2009;324:1330-4.
14. Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, et al. Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases. *Blood* 1998;91:1325-31.



15. Blackshear JL, Wysokinska EM, Safford RE, et al. Indexes of von Willebrand factor as biomarkers of aortic stenosis severity (from the Biomarkers of Aortic Stenosis Severity [BASS] study). *The American journal of cardiology* 2013;111:374-81.
16. Assad RS, Cardarelli M, Abduch MC, et al. Reversible pulmonary trunk banding with a balloon catheter: assessment of rapid pulmonary ventricular hypertrophy. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2000;120:66-72.
17. Godier A, Mazoyer E, Cymbalista F, Cupa M, Samama CM. Recombinant activated factor VII efficacy and safety in a model of bleeding and thrombosis in hypothermic rabbits: a blind study. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2007;5:244-9.
18. Ben-Dor I, Pichard AD, Satler LF, et al. Complications and outcome of balloon aortic valvuloplasty in high-risk or inoperable patients. *JACC Cardiovascular interventions* 2010;3:1150-6.
19. Tsai HM, Sussman, II, Nagel RL. Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood* 1994;83:2171-9.
20. Ott HW, Griesmacher A, Schnapka-Koepf M, et al. Analysis of von Willebrand factor multimers by simultaneous high- and low-resolution vertical SDS-agarose gel electrophoresis and Cy5-labeled antibody high-sensitivity fluorescence detection. *American journal of clinical pathology* 2010;133:322-30.
21. Dong JF. Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2005;3:1710-6.
22. Pareti FI, Lattuada A, Bressi C, et al. Proteolysis of von Willebrand factor and shear stress-induced platelet aggregation in patients with aortic valve stenosis. *Circulation* 2000;102:1290-5.
23. van Mourik JA, Boertjes R, Huisveld IA, et al. von Willebrand factor propeptide in vascular disorders: A tool to distinguish between acute and chronic endothelial cell perturbation. *Blood* 1999;94:179-85.
24. Xiong Y, Hu Z, Han X, et al. Hypertensive stretch regulates endothelial exocytosis of Weibel-Palade bodies through VEGF receptor 2 signaling pathways. *Cell research* 2013;23:820-34.
25. Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, Denis CV. Von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost*.

## Figures

### **Figure 1: Dynamic loss and recovery of HMW-multimers in a rabbit “reversible” aortic stenosis model**

**A:** Quantitative analysis of HMW-multimers (relative to baseline) after induction and reversion of aortic stenosis (repeated ANOVA,  $p < 0.01$  overall;  $n = 17$ ). Significant loss of HMW-multimers 5 minutes and 30 minutes after induction of stenosis ( $p < 0.01$  vs baseline) and immediate recovery 5 minutes and 30 minutes after reversion of stenosis ( $p < 0.01$  vs 30 minutes post induction) were observed.

**B:** Representative profile of VWF multimeric patterns at the different time points after induction and reversion of stenosis in one rabbit.

**C:** Densitometric analysis of electrophoretic gel image (black arrows indicate the front of migration, NP=normal human pooled plasma).

### **Figure 2: Immediate loss of HMW-multimers upon high shear stress at initiation of axial-continuous-flow HeartMate II® device**

**A:** Quantitative analysis of HMW-multimers (relative to normal human pooled plasma) after perfusion of human whole blood under high shear conditions (9000 rpm) in the HeartMate-II® (HM II) *in-vitro* model (repeated ANOVA,  $p < 0.0001$  overall;  $n = 10$ ). A significant loss of HMW-multimers occurred overtime, already significant 5 minutes after HeartMate-II® start ( $p < 0.01$  vs baseline) and complete at 180 minutes.

**B:** Representative time course of HMW-multimers loss (with densitometric analysis) after initiating the HeartMate-II® *in-vitro*.

**C:** Quantitative analysis of HMW-multimers (relative to normal human pooled plasma) in patients undergoing initiation of HeartMate-II® support (repeated ANOVA,  $p < 0.01$  overall;  $n = 8$ ). A significant loss of HMW-multimers occurred overtime, already significant 30 minutes after initiating the HeartMate-II® support ( $p < 0.01$  vs baseline).

**D:** Representative time course of HMW-multimers loss (with densitometric analysis) after initiating the HeartMate-II® support *in-vivo*. (B and D: black arrows indicate the front migration, NP=normal human pooled plasma).

**Figure 3: Pre and post-procedural transvalvular echocardiographic aortic valve evaluation in patients undergoing transcatheter aortic valve interventions**

**A:** Evolution of the maximum aortic velocity after TAVI or BAV procedure. Procedure induced a near normalization of mean aortic velocity in TAVI patients. Although significant, only a modest improvement was observed in BAV patients.

**B:** Evolution of the mean aortic transvalvular gradient after TAVI or BAV procedure. Procedure induced a near normalization of mean aortic transvalvular gradient in TAVI patients. Although significant, only a modest improvement was observed in BAV patients.

**Figure 4: Time course of HMW-multimers recovery in patients with severe aortic stenosis undergoing transcatheter aortic valve interventions**

**A:** Quantitative analysis of HMW-multimers in patients undergoing correction of aortic stenosis by TAVI (repeated ANOVA,  $p < 0.0001$  overall;  $n=10$ ). HMW-multimers recovery was significant 5 minutes after valve implantation ( $p < 0.05$ ) and complete at 180 minutes ( $p < 0.01$ ).

**B:** Representative time course of VWF multimeric pattern (with densitometric analysis) in a patient undergoing TAVI procedure.

**C:** Quantitative analysis of HMW-multimers in patients undergoing BAV procedure (repeated ANOVA,  $p=0.21$  overall;  $n=10$ ). No significant changes in VWF multimeric pattern occurred after valve dilatation.

**D:** Representative time course of VWF multimeric pattern (with densitometric analysis) in a patient undergoing BAV procedure.

**Figure 5: Real-time assessment of changes in VWF multimeric pattern with PFA-CADP in patients undergoing transcatheter aortic valve interventions.**

In TAVI-patients, a time-dependent correction of PFA-CADP was observed (repeated ANOVA,  $p < 0.0001$ ). In BAV-patients, no significant time-dependent change of PFA-CADP was observed.

### **Figure 6: VWF as a biomarker of transcatheter aortic valve interventions**

A loss of VWF HMW-multimers is observed in severe aortic stenosis consecutive to an increase in shear-induced proteolysis of VWF through the pathological aortic valve. A recovery of VWF HMW-multimers is observed early after a TAVI-mediated new aortic valve implantation whereas VWF multimeric profile remains unchanged after a BAV-mediated aortic valve dilatation. We proposed that the time course of HMW-multimers recovery following TAVI procedure is mediated by two mechanisms dependent on the correction of aortic stenosis: 1) A normalization in local aortic transvalvular shear stress conditions preventing the proteolysis of circulating HMW-multimers through the implanted aortic valve. 2) An increase of HMW-multimers release by the vascular endothelium secondary to an increase in arterial luminal pressure. Finally PFA-bedside assessment reflecting HMW-multimers changes could be used clinically to monitor in real-time the results of transcatheter aortic valve interventions.

**Von Willebrand Factor As A Biological Sensor Of Blood Flow To Monitor  
Percutaneous Aortic Valve Interventions: Insights From The Witavi Registry**

**Supplementary Appendix**

**Supplementary methods**

**Rabbit model of reversible aortic stenosis**

*Animals*

All experiments were conducted in syngeneic male New Zealand rabbits weighing 2.7–3 kg, of the same blood group. Animals were obtained from the CEGAV Breeding Colony (Les Hautes Noës, St Mars d’Egrenne, France). Rabbits were housed in individual cages under standard conditions of temperature (14–20°C) and light (12 h per day) with food and water provided ad libitum. All experiments were conducted in accordance with the European Communities Council directive (86/609/EEC) after approval was obtained from the local Ethics Review Board of Lille University, and conformed to the US National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals. Anaesthesia, ventilation and monitoring were performed as previously described <sup>1</sup>

*Aortic stenosis and reversion*

An adjustable silicone vascular clamp, consisting of a banding ring, a connecting tube and an inflation reservoir (Harvard Apparatus, Holliston, Kent, UK), was placed on the ascending aorta to induce a controlled circumferential stenosis. Non-inflated, the device was adjusted to the outside diameter of the aorta while inflation of the vascular clamp with a predefined

volume allowed a reproducible stenosis. The volume was defined to obtain a reduction in cross sectional area >75% as observed in patients with severe aortic stenosis <sup>2</sup>. Inflation and deflation using this device were performed in less than 5 seconds thus stenosis and its reversion were immediate.

#### *Blood sampling*

Blood samples were collected through a carotid artery catheter. Blood samples were obtained before stenosis (baseline), after induction of aortic stenosis (T5, T30). Then the stenosis was reversed 30 minutes after its induction and blood was sampled 5 and 30 minutes after reversion of the stenosis (T35, T60). Blood loss secondary to blood sampling was compensated by continuous isotonic NaCl infusion via the carotid catheter. At the end of the experiment, once the time course was completed, rabbits were sacrificed by injection of a 2mL of T-61 (Tanax ®). VWF antigen and multimeric profile were analyzed.

#### **VWF antigen and VWF multimeric analysis in rabbits**

All samples were collected in 0.129 M trisodium citrate tubes (9NC BD Vacutainer, Plymouth, UK) and centrifugated at 2500 g for 15 minutes. Poor-platelet plasma (PPP) was frozen and stored at -80°C until analysis.

Rabbits PPP-samples were tested for VWF antigen (VWF:Ag) by Elisa as recommended by the manufacturer (Cedarlane® CL20403K). Results were expressed relative to baseline values observed for each animal.

Rabbits PPP-samples were subsequently tested for VWF multimeric patterns via 1.4% SDS-agarose electrophoresis as previously described for human samples <sup>3</sup>, excepting for the revelation step. Loading of SDS-agarose gels was normalized for VWF:Ag content. The revelation step was adapted for rabbit species using a polyclonal anti-human VWF antibody (Cedarlane® CL20403K), cross-reacting with rabbit VWF, that was conjugated to alkaline

phosphatase enzyme (Lynx rapid alkaline phosphatase antibody conjugation kit, AbD serotec®). VWF multimeric pattern was detected via alkaline phosphatase-mediated NBT/BCIP (Nitroblue Tetrazolium / 5-Bromo- 4-Chloro-3-Indolyl Phosphate) hydrolysis. HMW-multimers were determined using densitometric scanning. Results were expressed relative to baseline values determined for each rabbit.

### **HeartMate-II® assist device model**

Anticoagulated whole human blood (250 mL) was perfused in a circulatory perfusion system incorporating a HeartMate-II® pump (Thoratec Corp., Pleasanton, California). Two cylindrical tubings (1x2 x 3/32 xs; Sorin Group Implant®) were used to connect the device. The inlet and outlet ducts of the HeartMate-II® were connected with these two tubings to obtain a closed circuit. HeartMate-II® rotation was set to 9,000rpm. Samples were taken 5 min before the onset of perfusion (baseline) and after 5 min (T5), 30 min (T30) or 180 min (T180).

### **Assessment of VWF proteolysis as underlying mechanism of HMW-multimers loss induced by HeartMate-II® support**

#### *Spiking experiments in the presence of EDTA*

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA 10mM -Sigma®) was spiked in whole human blood before the initiation of the HeartMate-II® pump. Subsequently blood was perfused under high shear conditions (9,000rpm). Blood was sampled before the onset of perfusion (T0) and after 5 min (T5), 30 min (T30) or 180 min (T180).

### *VWF proteolysis fragments analysis by immunoprecipitation/western-blot*

VWF proteolysis fragments were assessed in 3 HeartMate-II®-patients via western-blot analysis of immuno-precipitated VWF. VWF was immuno-precipitated using rabbit polyclonal anti-VWF antibodies (50 µg/ml beads; Dako, Glostrup, Danmark) adsorbed onto Protein-G coated magnetic beads (Dynabeads Protein G, Invitrogen, Saint Aubin, France) for 2 h at room temperature. After extensive washing in PBS/0.1 % Tween-20, immunoprecipitated VWF was released from the beads via a 5 min incubation at 100°C in 30 µL PBS/10 µL NuPAGE-LDS 4×sample buffer (Life Technologies, Saint Aubin, France) in the presence of 2 mM dithiothreitol. Electrophoresis was performed using discontinuous 4-12% SDS-page (Invitrogen). After transfer to an Immobilon P membrane (Millipore, Molsheim, France), the presence of VWF proteolysis fragments was revealed via incubation with a pool of 10 distinct monoclonal antibodies recognizing distinct epitopes of VWF (10 µg/ml). Bound antibodies were probed using peroxidase-labeled goat anti-mouse antibodies (dilution 1:500; Santa Cruz, Heidelberg, Germany) and visualized with SuperSignal West-Pico Enhanced Chemiluminescence Substrate (Thermo-Fischer Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Blots were analyzed via ImageJ-1.44 software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) in order to quantify uncleaved VWF (225 kDa bands) and VWF proteolysis fragments (140 kDa and 176 kDa bands).

### *Shear-dependency of the loss of HMW-multimers*

Anticoagulated whole human blood was perfused either under high shear stress (pump set at 9,000rpm) or low shear stress (pump set at 3,000) conditions for three hours. Blood was sampled before (baseline) and after starting the pump (T5, T30 and T180 minutes).



## Supplementary references

1. Godier A, Mazoyer E, Cymbalista F, Cupa M, Samama CM. Recombinant activated factor VII efficacy and safety in a model of bleeding and thrombosis in hypothermic rabbits: a blind study. *J Thromb Haemost* 2007;5(2):244-9.
2. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, et al. Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *J Am Soc Echocardiogr* 2009;22(1):1-23; quiz 101-2.
3. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, et al. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N Engl J Med* 2003;349(4):343-9.

## Supplementary legends to figures

### **Figure S1. Shear-induced proteolysis as the underlying mechanism of the loss of HMW-multimers of VWF after initiation of HeartMate-II® support**

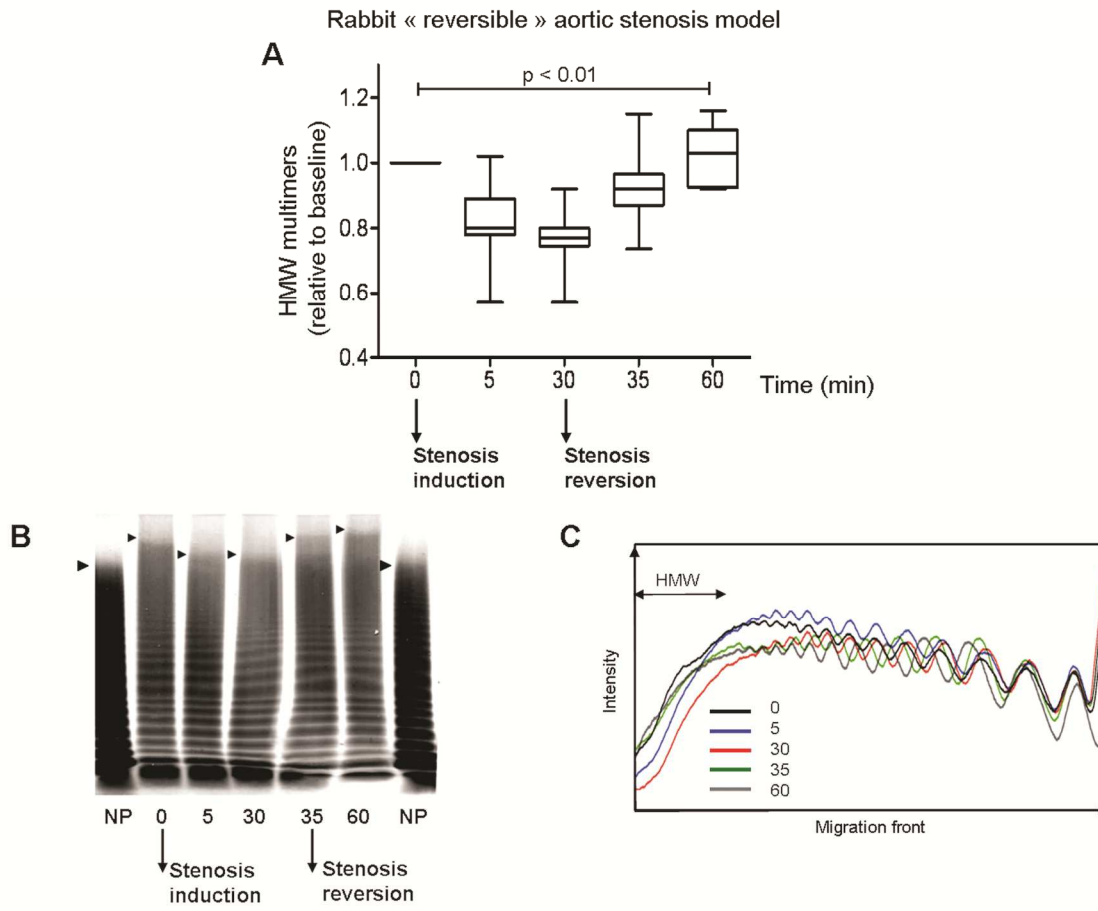
A: VWF proteolysis was assessed via Western blot analysis. A Representative time course of immuno-precipitated VWF proteolytic bands (140 and 176 kDa bands) under high shear conditions (9,000rpm) and densitometric integration of 3 western blots obtained in patients undergoing implantation of HeartMate-II® LVAD are presented. Results (mean±SD) are expressed as a ratio versus baseline. A time-dependant increase in immuno-precipitated VWF proteolytic bands was observed.

**B, C:** *In-vitro*, no loss of HMW-multimers was observed under high shear conditions (9,000 rpm) when spiking a protease inhibitor (EDTA 10mM) before pump initiation (**B**) nor at low shear (3,000 rpm) (**C**).

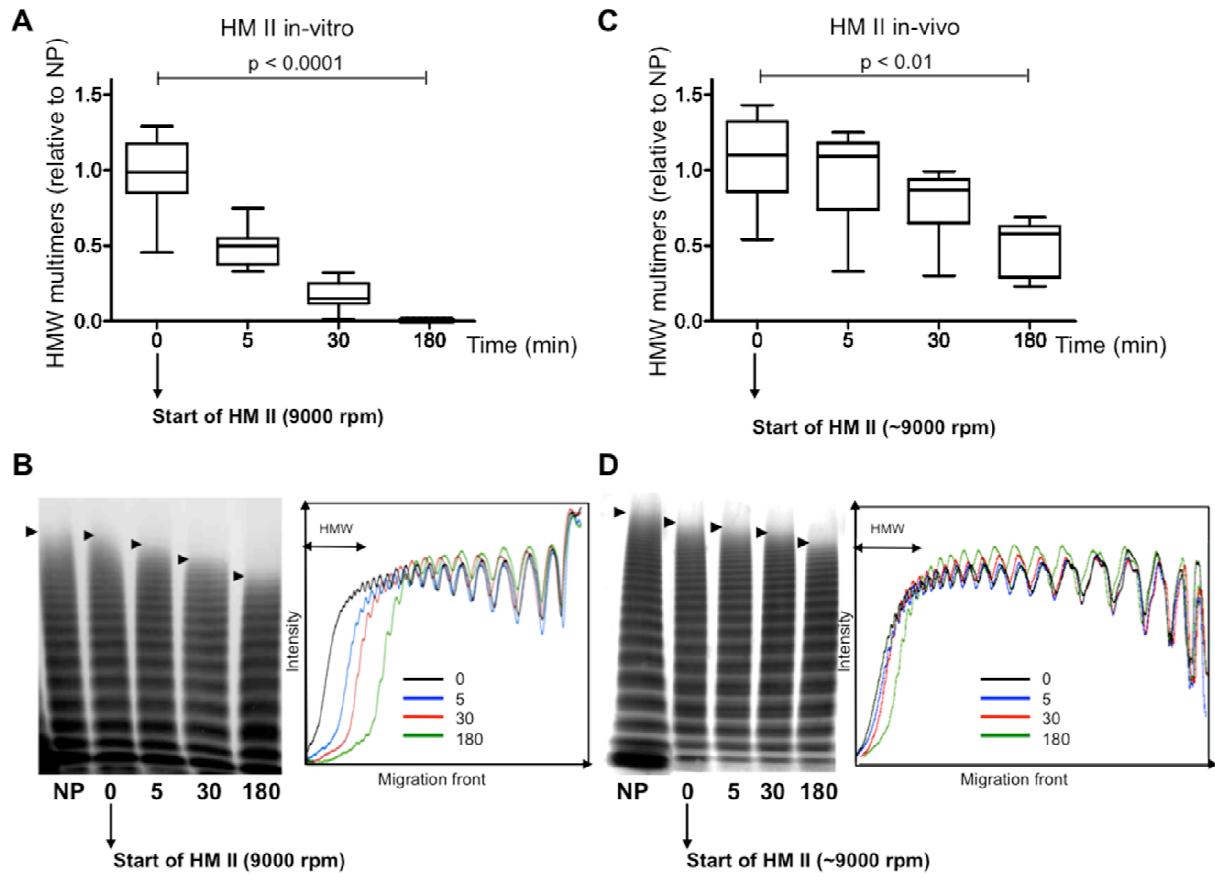
### **Figure S2. Absence of HMW-multimers recovery after reversion of pathological high shear in the HeartMate-II® assist device model**

Whole human blood was submitted to high shear (9,000rpm) during 3 hours and then to low shear for the next 3 hours (3,000 rpm) by switching the pump. The VWF multimeric profile remained unchanged after the offset of high shear stress.

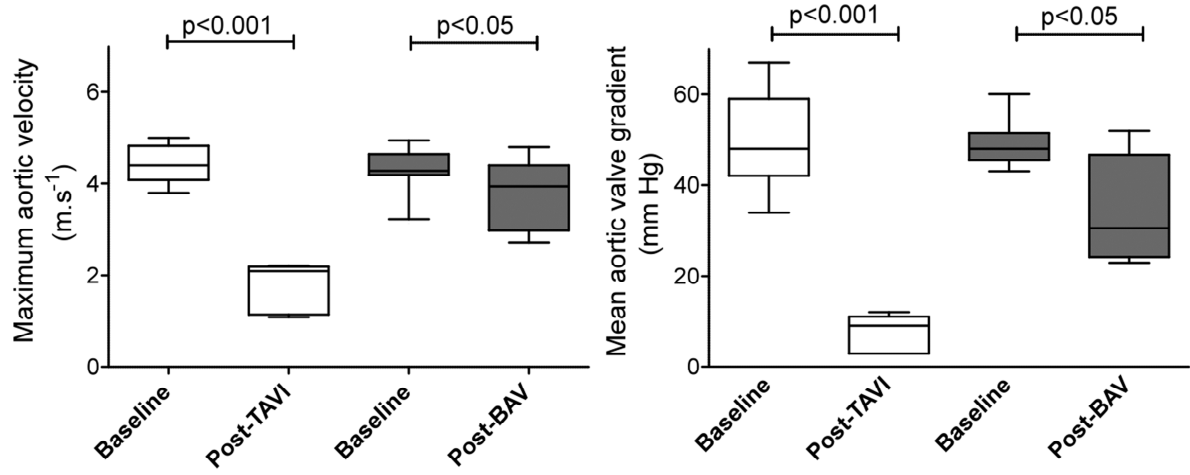
**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**

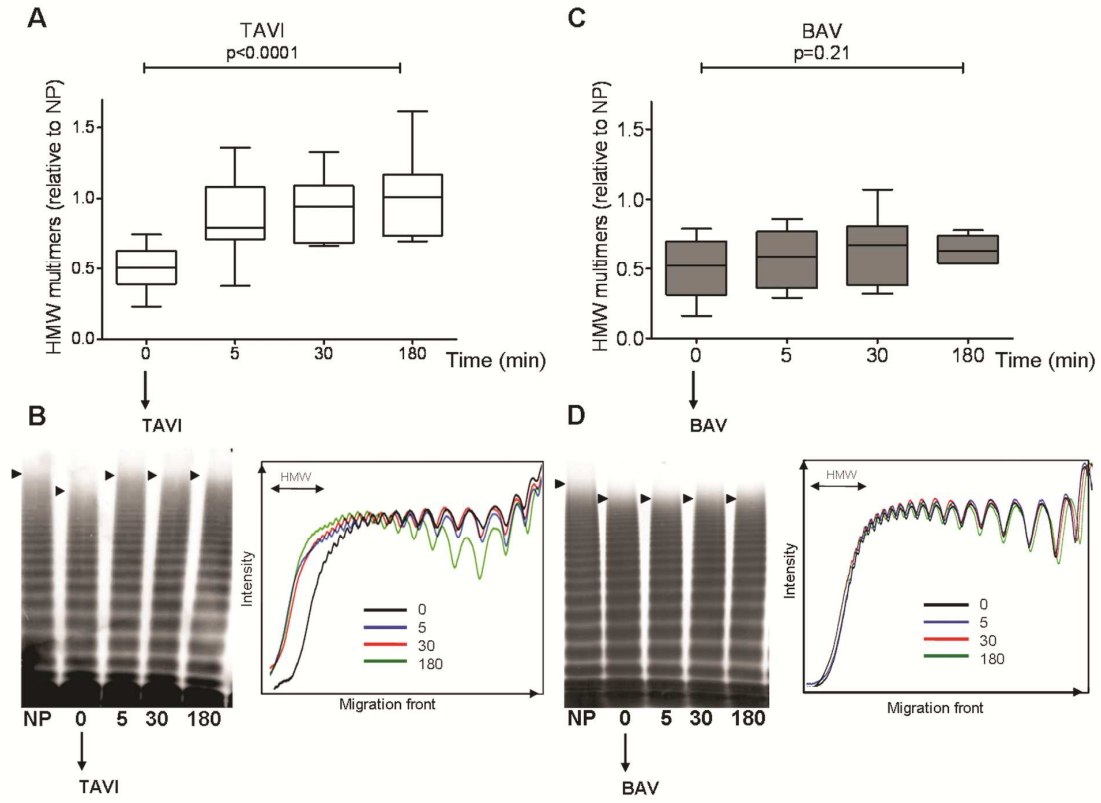
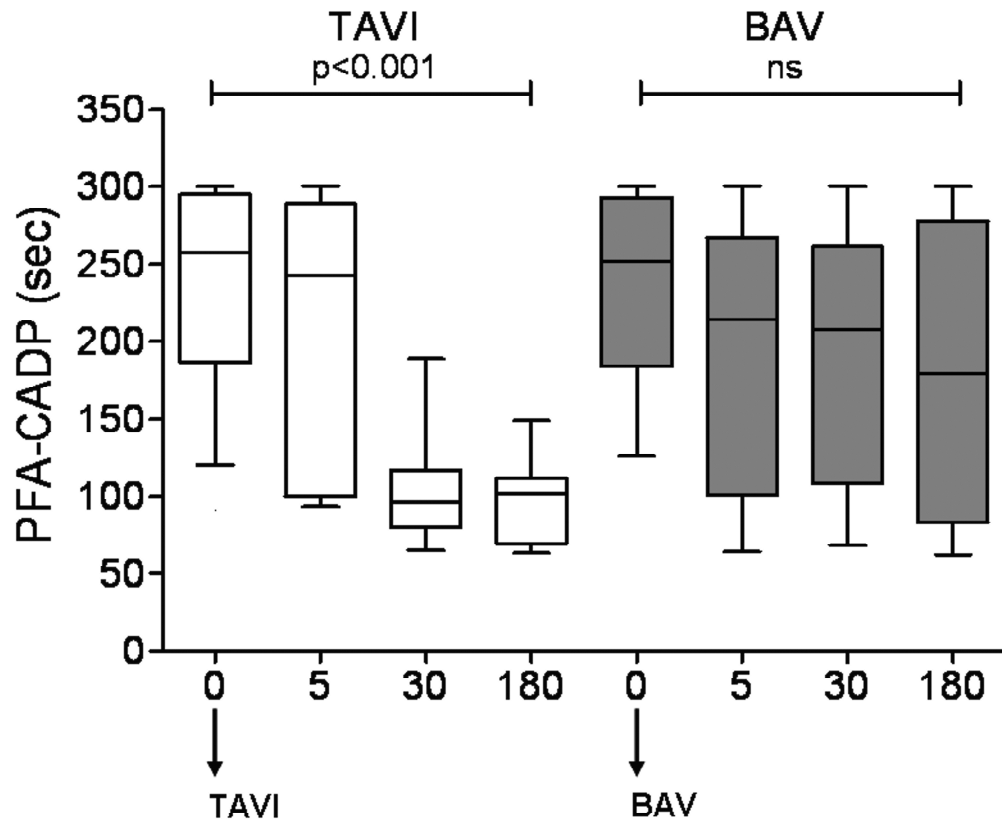
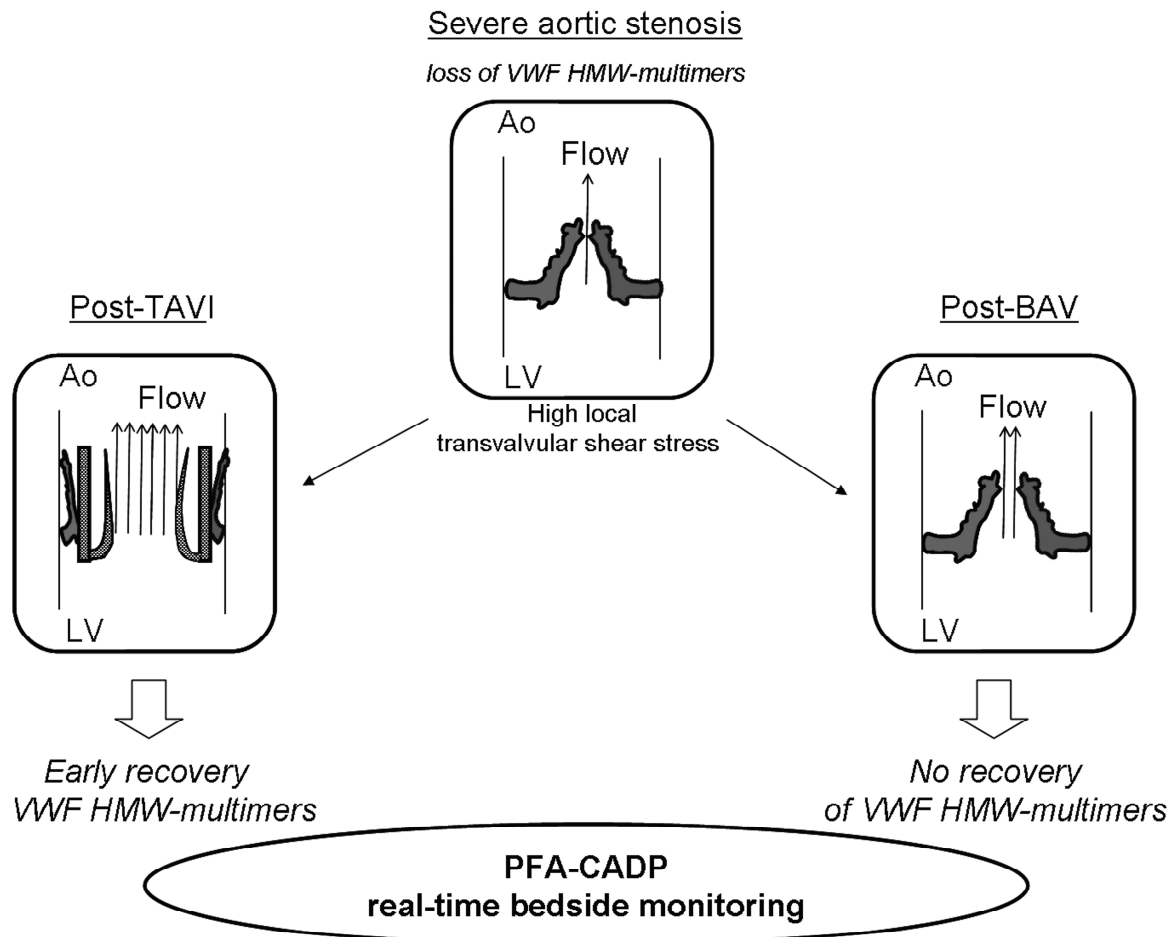


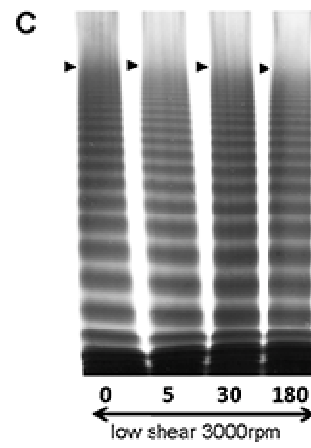
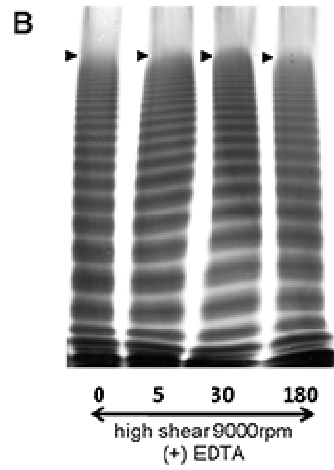
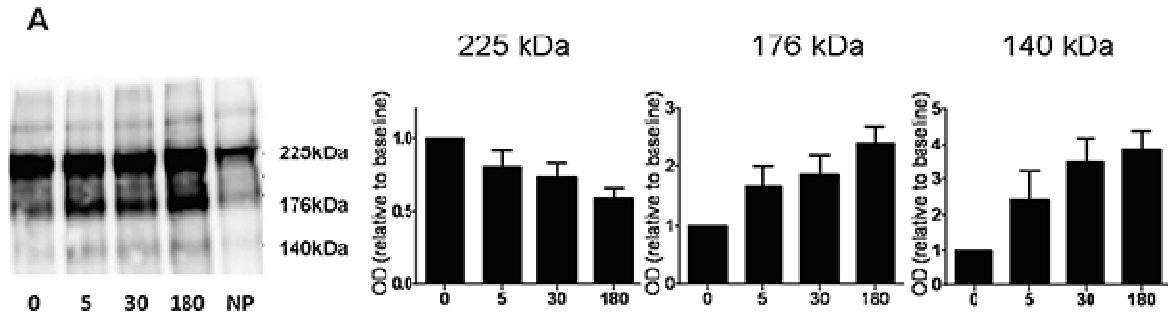
Figure 5



**Figure 6**

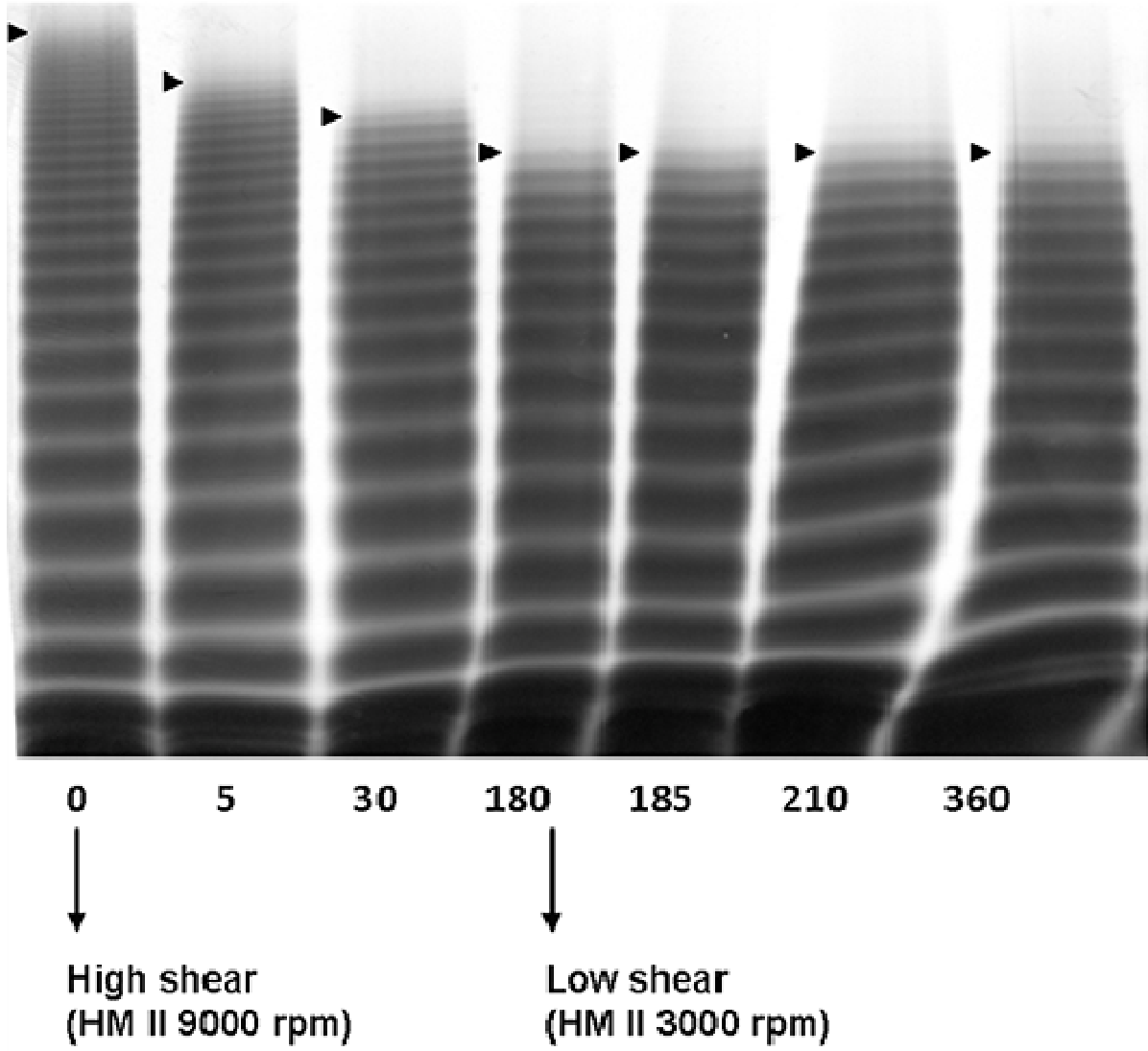


# Suppl Figure 1





Suppl Figure 2



## **CHAPITRE 2 : Prévention de la dégradation du VWF sous ACM-FC**

**Publication 2:** Antibody-based prevention of von Willebrand factor degradation mediated by circulatory assist devices

Rauch A, Legendre P, Christophe OD, Goudemand J, van Belle E, Vincentelli A, Denis CV, Susen S, Lenting PJ. *Thromb Haemost.* 2014 Jul 17;112(5). (Epub ahead of print)

La protéase plasmatique ADAMTS13 régule la taille des multimères de VWF plasmatique et ainsi leur fonction pro-hémostatique. Les bases moléculaires de la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13 ont été amplement étudiées ces dernières années. Le clivage du VWF intervient au niveau d'une liaison peptidique unique, Y<sup>1605</sup>-M<sup>1606</sup>, localisée au sein du domaine A2. Cette protéolyse nécessite un alignement adéquat du site catalytique métalloprotéase de l'ADAMTS13 et du domaine A2 du VWF, obtenu grâce à une interaction préalable de ces deux molécules au niveau de différents exosites. Concernant le VWF, les exosites impliqués dans cette interaction sont localisés au niveau des domaines A2 et D4, mais seul ce dernier est accessible spontanément à l'ADAMTS13. En conditions de flux normales, le VWF plasmatique circule en effet sous une conformation globulaire, au sein de laquelle les exosites et le site de clivage Y<sup>1605</sup>-M<sup>1606</sup> du domaine A2, profondément enfoui dans la molécule, sont inaccessibles à l'ADAMTS13. Bien que l'interaction entre le domaine A2 du VWF et l'ADAMTS13 soit un pré-requis à la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13, cette liaison n'intervient que dans certaines conditions associées à une élongation des multimères de VWF. Ce mécanisme de régulation mécano-enzymatique protège le VWF natif d'une dégradation spontanée par l'ADAMTS13 dans le flux sanguin et limite physiologiquement l'action de l'ADAMTS13 à certaines situations spécifiques à risque thrombotique : 1) L'ADAMTS13 protéolyse les méga-multimères endothéliaux de VWF, dès leur sortie des corps de Weibel-Palade, prévenant ainsi la libération dans le sang de ces formes hyperfonctionnelles de VWF. 2) Le VWF lié aux plaquettes, au sein du thrombus en formation, a également une conformation étendue favorable à sa protéolyse par l'ADAMTS13, qui contribue ainsi à limiter la croissance du caillot.

Deux pathologies témoignent chez l'homme de l'importance physiologique de la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13. Un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 est associé à une micro-angiopathie thrombotique : le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT). A l'inverse, une protéolyse excessive du VWF par l'ADAMTS13 peut se voir dans différentes formes héréditaires ou acquises de maladie de Willebrand (VWD), et se manifester par des hémorragies sévères. Ceci est le cas de la VWD de type 2A mais aussi des syndromes de Willebrand acquis associés au rétrécissement aortique (Rao) ou aux assistances circulatoires mécaniques à flux continu (ACM-FC). Ces deux dernières conditions sont caractérisées une perte des VWF-HPM, une augmentation des produits de dégradation du VWF et une incidence élevée d'hémorragies cutanéomuqueuses notamment digestives.

Les hémorragies digestives sous ACM-FC constituent un véritable enjeu thérapeutique en raison de leur prévalence élevée et de leur impact négatif en termes de survie et de qualité de vie. Leur survenue complique singulièrement la prise en charge des patients sous ACM-FC, chez qui une anticoagulation curative est indiquée en prévention primaire d'événements artériels thrombotiques. Ces hémorragies digestives régressent classiquement après le traitement de l'anomalie causale : remplacement valvulaire aortique ou greffe cardiaque. Cependant, cette dernière option est rarement envisageable pour les patients sous assistance ventriculaire gauche, en raison de la pénurie en greffons cardiaques ou d'éventuelles comorbidités contre-indiquant la greffe.

Un traitement préventif ou curatif du syndrome de Willebrand acquis associé à un excès de protéolyse du VWF par l'ADAMTS13, constituerait une réelle avancée thérapeutique pour les patients sous ACM-FC. Le développement de molécules ciblant spécifiquement un des exosites impliqués dans la liaison VWF-ADAMTS13 semble une

approche fondée car cette interaction est nécessaire pour permettre la protéolyse du VWF. De plus, une telle approche est théoriquement compatible avec le maintien d'une protéolyse résiduelle du VWF et semble donc associée à un risque faible de PTT pharmaco-induit.

Nous avons testé deux classes de molécules dans cette optique : une librairie d'anticorps monoclonaux anti-VWF ou anti-ADAMTS13 issus de cultures d'hybridomes murins et des fragments recombinants de VWF ou d'ADAMTS13 produits par transfection stables de cellules eucaryotes BHK (Baby Hamster Kidney).

Dans un premier temps, nous avons ciblé comme molécules d'intérêt celles inhibant partiellement la liaison du VWF à l'ADAMTS13 *in-vitro*. Cette étape de dépistage a reposé sur un test d'immunoabsorption permettant la mesure de la liaison entre VWF purifié d'origine plasmatique et ADAMTS13 recombinante humaine, en présence d'EDTA. Nous avons ainsi identifié les fragments A2-Fc et l'anticorps 508 (Ac508) comme potentiels inhibiteurs candidats.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié le potentiel des deux molécules sélectionnées à inhiber la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13 en conditions de flux *in-vitro*. Ces conditions ont été artificiellement reproduites dans un modèle de mini-vortex, permettant une consommation très limitée de réactifs. Nous avons ainsi co-incubé VWF et ADAMTS13 dans un aliquot à PCR pendant une heure sur un mini-vortex en présence soit du fragment A2-Fc, soit de l'Ac508. Après arrêt de la réaction par EDTA, la protéolyse du VWF a été évaluée semi-quantitativement par l'analyse de l'augmentation ou non des fragments de protéolyse du VWF (140 et 176 kDa) dans ces différentes conditions. La mise en évidence des fragments de protéolyse s'est effectuée par Western blot avec au préalable une étape d'enrichissement des échantillons en VWF par immuno-précipitation. Seul l'Ac508 s'est révélé inhiber la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13 dans ces conditions expérimentales.

Nous avons ensuite voulu caractériser le mode d'action et le potentiel à visée thérapeutique de l'Ac508. La compréhension du mécanisme d'action de l'Ac508 a nécessité la localisation de son épitope. Celle-ci s'est effectuée en deux étapes. Tout d'abord, nous avons évalué l'interaction de l'Ac508 à différents fragments de VWF d'origine recombinante ou enzymatique en ELISA et en immuno-dot. Nous avons ainsi localisé l'épitope de cet anticorps dans la partie distale du domaine D4 du VWF. Nous avons ensuite testé un panel de peptides synthétiques biotinylés chevauchants correspondants à la séquence en acides aminés de la partie distale du domaine D4. Nous avons ainsi réduit l'épitope de l'Ac508 à une courte séquence polypeptidique de 12 acides aminés au sein du domaine D4. Le domaine D4 comporte un épitope qui permet la liaison du VWF natif, sous sa conformation globulaire à la partie distale de l'ADAMTS13 (domaines TSP5-8 et CUB1-2). Cette liaison VWF-ADAMTS13 est nécessaire mais non suffisante pour permettre la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13. Au total, nous avons déduit le mécanisme d'action suivant : l'Ac508 en inhibant l'étape initiale de l'interaction VWF-ADAMTS13 permet une inhibition de la protéolyse du VWF par l'ADAMTS13.

Nous avons ensuite effectué la caractérisation biochimique de l'Ac508 pour évaluer son intérêt à visée thérapeutique. Son affinité pour le VWF a été estimée par la technique « bio-layer interferometry » (BLI) à l'aide de l'Octet (ForteBio®). La BLI est une technique analytique basée sur le principe d'interférométrie optique, qui permet de mesurer en temps réel l'interaction entre 2 ligands à la surface d'une fibre optique. La BLI permet ainsi de déterminer les constantes cinétiques de vitesse d'association et de dissociation ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) et l'affinité à l'équilibre de la réaction ( $K_D$ ). Cette technique est peu consommatrice d'échantillon et s'avère performante pour l'étude d'échantillons purifiés. L'Octet a mis en évidence une interaction dose-dépendante et d'affinité moyenne entre l'Ac508 et le VWF.

Nous avons ensuite estimé le pouvoir inhibiteur de l'Ac508 via un test d'inhibition compétitive de la liaison VWF-ADAMTS13 en microplaque. Nous avons ainsi confirmé que l'Ac508 inhibait partiellement la liaison VWF-ADAMTS13 avec une inhibition maximale de 50% environ. Nous avons estimé sa concentration inhibitrice 50 (IC50) à  $0.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , soit une concentration compatible avec son utilisation *in-vivo*.

En l'absence de modèle animal murin adapté à l'évaluation *in-vivo* de l'Ac508, nous avons utilisé un modèle *ex-vivo* en sang total pour évaluer son efficacité dans la prévention de la dégradation du VWF sous ACM-FC. Dans ce modèle, l'Ac508 inhibe de façon dose-dépendante la dégradation des VWF-HPM. De façon notable, il persiste une protéolyse résiduelle du VWF en présence de fortes concentrations d'Ac508 comparé à l'inhibition complète observé avec l'EDTA.

Nous démontrons ainsi qu'une prévention de la dégradation du VWF sous ACM-FC est possible via un anticorps monoclonal ciblant l'interaction VWF-ADAMTS13 au niveau du domaine D4 du VWF. Cette approche pourrait être associée à un risque faible de PTT pharmaco-induit car elle permet le maintien d'une protéolyse résiduelle du VWF.

**Antibody-based prevention of von Willebrand factor degradation mediated by circulatory assist devices**

Antoine Rauch<sup>1,2,3,4</sup>; Paulette Legendre<sup>1,2</sup>; Olivier D. Christophe<sup>1,2</sup>; Jenny Goudemand<sup>3,4</sup>; Eric van Belle<sup>4,5</sup>; André Vincentelli<sup>4,5</sup>; Cécile V. Denis<sup>1,2</sup>; Sophie Susen<sup>3,4</sup>; Peter J. Lenting<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM Unit 770, Le Kremlin-Bicêtre, France; <sup>2</sup>UMR\_S 770, Univ Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France ; <sup>3</sup>Department of Hematology & Transfusion, Lille University Hospital, Lille, France; <sup>4</sup>Equipe d'Accueil 2693, Lille-II University, Lille, France ; <sup>5</sup>Department of Cardiology, Lille University Hospital, Lille, France

Correspondence

Peter Lenting

INSERM U770, 80 rue du General Leclerc

92476 Le Kremlin-Bicêtre, France

Tel: +33 149595651 Fax: +33 146719472

E-mail: peterlenting@inserm.fr

Running title: Antibody-based inhibition of VWF degradation

Funding: This study was supported by the Institute Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) and Lille-II University



## **Abstract**

Haemorrhagic episodes in patients carrying circulatory assist devices represent a severe life-threatening clinical complication. These bleeding episodes may originate from a reduced functionality of von Willebrand factor (VWF), a multimeric protein pertinent to the formation of a haemostatic plug. It has been reported that the reduced functionality is due to increased proteolytic degradation by the enzyme ADAMTS13, a phenomenon that is facilitated by device-induced increases in shear stress to which VWF is exposed. Here, we have tested a series of VWF-derived protein fragments and monoclonal murine anti-VWF antibodies for their capacity to reduce shear stress-dependent degradation of VWF. Via direct binding experiments, we identified an anti-VWF antibody that partially blocked VWF-ADAMTS13 interactions ( $46 \pm 14\%$ ). Epitope mapping experiments revealed that the antibody, designated mAb508, is directed against the distal portion of the VWF D4-domain (residues 2134–2301) and recognises a synthetic peptide encompassing residues 2158–2169. Consistent with its partial inhibition of VWF-ADAMTS13 interactions in binding assays, mAb508 reduced ADAMTS13-mediated VWF degradation in a vortex-based degradation assay by  $48 \pm 10\%$ . In a HeartMateII-based whole blood perfusion system, mAb508 was able to reduce degradation of highmolecular-weight (HMW)-VWF-multimers dose-dependently, with a maximal inhibition ( $83 \pm 8\%$ ) being reached at concentrations of  $10 \mu\text{g/ml}$  or higher. In conclusion, we report that partial inhibition of VWF-ADAMTS13 interactions using an anti-VWF antibody can prevent excessive degradation of HMW-VWF multimers. This strategy may be used for the development of therapeutic options to treat bleeding episodes due to shear stress-dependent VWF degradation, for instance in patients carrying circulatory assist devices.

**Keywords:** von Willebrand factor, ADAMTS13, circulatory assist devices, acquired von Willebrand syndrome, antibody therapy

## Introduction

Von Willebrand factor (VWF) is a multimeric glycoprotein that plays an essential role in the formation of platelet-rich thrombi, particularly under conditions of high shear stress. The main source of circulating VWF are the endothelial cells, where it is synthesized as a single chain pro-subunit with a discrete domain architecture, which was recently re-annotated: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK (1). Intra-cellular processing results in the removal of the propeptide (D1-D2 domains), and multimerisation of the protein via amino and carboxy-terminal disulfide bonding (2). These processes generate a heterologous pool of differentially sized multimers that may contain as many as 60 subunits, which are stored in the endothelial Weibel-Palade bodies and secreted into plasma via constitutive and agonist-induced pathways (3).

The multimer size of VWF is pertinent to its platelet-recruiting function, with the larger multimers displaying the highest haemostatic potential. In normal plasma, the multimers may contain between 2 and 40 subunits (1-20 bands when analysed by SDS-agarose electrophoresis [4]), which are shorter than those found in the endothelial storage organelles. Indeed, mechanisms are in place regulating VWF multimer size in the circulation, including proteolysis by the VWF-cleaving protease ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin domains-13) (5).

The molecular basis of VWF proteolysis by ADAMTS13 has been extensively studied (6). A number of interactive sites have been identified, including the A2- and D4-domains of VWF, which are important for the proper alignment of the ADAMTS13 active site (7-9). This active site attacks the Tyr1605-Met1606 peptide bond that is located within the VWF A2 domain (10). Interestingly, access to this peptide bond relies on the shear stress-induced unfolding of the substrate (for review see [11]), thereby protecting it against degradation while circulating

normally, and limiting proteolysis to specific conditions. One of these conditions occurs when multiple VWF multimers assemble into large stretched bundles attached to the endothelial surface upon agonist-induced secretion. These bundles are not only capable of catching platelets, but their stretched conformation allows proteolysis by ADAMTS13 thereby preventing the release of platelet-binding ultra-large VWF multimers into the circulation (12, 13). Another condition favouring proteolysis occurs when VWF binds to platelets within the growing thrombus. This opens the ADAMTS13 cleavage site, and subsequent proteolysis results in reduction of VWF multimer size (14). Consequently, the platelet-binding capacity is diminished, avoiding excessive thrombus growth that could occlude the vessel.

The physiological relevance of ADAMTS13-mediated proteolysis of VWF is apparent from the severe thrombotic micro-angiopathy that is associated with the functional deficiency of ADAMTS13, a disorder known as thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) (15). In contrast, increased proteolysis of VWF by ADAMTS13 leads to a bleeding diathesis, as is exemplified by von Willebrand disease (VWD)-type 2A. VWD-type 2A is caused by mutations (mostly in the VWF A2 domain) that result in excessive proteolysis of the VWF by ADAMTS13, with a concomitant loss of the higher haemostatically active multimers (16). Another example relates to acquired von Willebrand syndrome (aVWS), where increased VWF proteolysis has been associated with various clinical settings, like aortic stenosis (17, 18) and ventricular assist devices (VADs) therapy (19, 20). Both conditions are characterized by an increased incidence of bleedings, especially gastrointestinal (GI) bleedings (20, 21), in association with a selective loss of high molecular-weight (HMW)-multimers and an increase in VWF degradation products (18, 22). aVWS usually resolves after aortic valve replacement

or discontinuation of VAD support (18, 20, 23,24). However, the latter is limited by graft availability and GI bleeding represents thus the most challenging complication under VAD support.

Overall there is a clear unmet medical need for a treatment targeting specifically excessive degradation of HMW-VWF multimers, for instance induced by circulatory assist devices. Ideally, such treatment should only partially interfere with VWF degradation in order to prevent drug-induced TTP-like symptoms. We hypothesised that interfering with VWF-ADAMTS13 binding exosites might subsequently provide a partial inhibition of VWF proteolysis. Here, we describe a monoclonal anti-VWF D4 domain antibody supporting this proof of concept. Biochemical analysis revealed a potent partial inhibitory effect on VWF-ADAMTS13 interactions. Its potential to diminish VWF proteolysis was confirmed using a recently developed ex vivo model of increased VWF degradation in whole blood induced by a circulatory assist device, which faithfully reproduces the biological phenotype of aVWS.

## **Materials and methods**

### **Proteins**

Purified plasma-derived (pd)-VWF and recombinant (r)-VWF were obtained as described previously (25, 26). All r-VWF fragments were produced using stably transfected BHK-cell lines. Transfection was performed using pNUT- or pFUSE-plasmids that contained synthetic cDNA sequences. cDNAs cloned into pNUT contained a 5'-sequence encoding the VWF signal peptide to allow secretion and a 3'-sequence encoding the HPC4 recognition motif (amino acid sequence EDQVDPRLIDGK). D'D3-HPC4 was obtained via the expression of a pNUT-plasmid encoding VWF-residues 1-1247. The purified protein lacks the VWF propeptide (residues 1-763) and is dimeric. A1A2A3-HPC4 and D4-HPC4 include VWF-residues 1261-1872 and 1947-2301, respectively. HPC4-tagged proteins were purified to homogeneity using HPC4-immuno affinity chromatography as instructed by the manufacturer (Roche Diagnostics, Meylan, France). A1-Fc, A2-Fc, A3-Fc and D4-Fc include VWF residues 1261-1478, 1480-1672, 1681-1878 and 1947-2301, respectively. A13-1-685-Fc includes residues 1-685 of ADAMTS13. All proteins expressed using the pFUSE contained a C-terminal Fc sequence of human IgG1 and were dimeric. Fc-tagged proteins were purified to homogeneity using protein A-Sepharose as instructed by the manufacturer (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France).

A panel of 29 monoclonal murine antibodies against human VWF was established in the 1980s (27, 28). Monoclonal antibodies were purified to homogeneity as described (27). Recombinant wild-type ADAMTS13 (wt-rADAMTS13) containing a V5- and a His-tag was produced as described (29). Conditioned medium enriched in wt-rADAMTS13 that was concentrated five-fold using an Amicon Ultra-15 centrifugal filter unit with a Ultracel-30K membrane (Millipore, Molsheim, France) and extensively dialysed against 50mM Tris, pH

7.4 was used throughout the study. Bovine Serum Albumin (BSA) was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

### **Binding of wt-rADAMTS13 to VWF**

pd-VWF (2 µg/ml) was adsorbed to microtitre wells. After blocking with BSA-containing buffer, immobilised VWF was incubated with supernatant containing wt-rADAMTS13 (3 µg/ml) supplemented with EDTA (10 mM) and Pefabloc (10 mM) for 3 hours (h) at 37°C. Bound wt-rADAMTS13 was probed using a peroxidase-labelled monoclonal anti-V5 tag antibody (Abcys, Paris, France) for 2 h at 37°C and detected via peroxidase-mediated hydrolysis of tetramethylbenzidine (TMB). VWF fragments (10 nM final concentration, unless indicated otherwise) or anti-VWF antibodies (0.1 mg/ml final concentration, unless indicated otherwise) were pre-incubated with wt-rADAMTS13 for 30 minutes (min) at room temperature before addition to VWF containing microtiter wells.

### **Vortex-based VWF degradation assay**

Vortex-based degradation of VWF was essentially performed as described (30). Briefly, purified pd-VWF (30 µg/ml), wt-rADAMTS13 (3 µg/ml) and Pefabloc (2.5 mM; Sigma-Aldrich) were incubated in a volume of 40 µl and exposed to constant vortexing (2500 rpm; Vortex Genie 2T; VWR International) for the indicated time. Where indicated, samples were supplemented with EDTA (10 mM), polyclonal goat anti-ADAMTS13 antibodies (50 µg/ml), A2-Fc (1 µg/ml) or mAb508 (0.1 mg/ml). VWF degradation was assessed via Western blot analysis, which was preceded by immuno-precipitation using anti-VWF antibodies where indicated. VWF was immuno-precipitated using rabbit polyclonal anti-VWF antibodies (50 µg/ml beads; Dako, Glostrup, Danmark) adsorbed onto Protein-G-coated magnetic beads (Dynabeads Protein G, Invitrogen, Saint Aubin, France) for 2 h at room temperature. After

extensive washing in PBS/0.1 % Tween-20, immunoprecipitated VWF was released from the beads via a 5 min incubation at 100°C in 30 µl PBS/10 µl NuPAGE-LDS 4x sample buffer (Life Technologies, Saint Aubin, France) in the presence of 2 mM dithiothreitol. Samples were separated via discontinuous 4-12% SDS-page (Invitrogen) and transferred to an Immobilon P membrane (Millipore, Molsheim, France). The presence of VWF or degradation fragments was revealed via incubation with a pool of 10 distinct monoclonal antibodies recognising distinct epitopes of VWF (10 µg/ml). Bound antibodies were probed using peroxidase-labelled goat anti-mouse antibodies (dilution 1:500; Santa Cruz, Heidelberg, Germany) and visualised with SuperSignal West-Pico Enhanced Chemiluminescence Substrate (Thermo-Fischer Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Blots were analysed via ImageJ® 1.44 software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) in order to quantify increase in VWF degradation products (represented by the presence of 140 kDa and 176 kDa bands) relative to untreated VWF.

### **Antibody binding to synthetic peptides**

A series of nine highly purified (>95%) synthetic peptides overlapping various hydrophilic motifs of the D4 domain region 2140-2277 containing a N-terminal biotin tag were obtained from EZBiolab (Carmel, IN, USA). Peptides were solubilised in H<sub>2</sub>O, eventually supplemented with one-sixth volume of 10% NH<sub>4</sub>OH to improve solubility if necessary. Peptides were immobilised onto streptavidin-coated microtiter plates (SigmaScreen Streptavidin High Capacity, Sigma-Aldrich) at a concentration of 50 µg/ml. Peptide-coated wells were incubated with mAb508 or mouse isotype IgG (5 µg/ml) in PBS containing 3% BSA. Bound antibody was probed using peroxidase-labelled polyclonal anti-mouse IgG and detected via peroxidase-mediated hydrolysis of TMB.

### **Biolayer interferometry-analysis**

Equilibrium binding assays were performed via biolayer interferometry (BLI)-analysis using Octet-QK equipment (ForteBio, Reading, UK) essentially as described (26). Protein A-coated biosensors were incubated with mAb508 (0.5 mg/ml) in BLI-buffer (PBS / 2% BSA) for 7 min allowing saturation of the sensor. Biosensors were then incubated for 5 min in BLI-buffer to achieve stable baseline, and subsequently incubated with various concentrations of pd-VWF in BLI-buffer for 10 min. All incubations were performed at room temperature under continuous shaking (1000 rpm). Data were analysed using Octet Software version 4.0.

### ***Ex vivo* whole blood perfusion**

The perfusion system consisted of a circulatory flowing pump device in which the HeartMateII® (Thoratec Corp., Pleasanton, CA, USA) was the pump. Two cylindrical tubings (1×2×3/32 xs; Sorin group Implant®) were used to connect the device. The inlet and outlet ducts of the HeartMateII® were connected with these two tubings to obtain a closed circuit, which further contained a sampling device. The distribution volume was approximately 250 ml. The system was filled with citrate-anticoagulated whole blood (blood group O) provided by the local blood bank (Etablissement Français du Sang, Lille, France). Where indicated, blood was supplemented with EDTA (10 mM final concentration) or antibody mAb508 (0.5-50 µg/ml final concentration). The pump rotor was set at 9000 rpm, a speed that is normally applied upon patient use (31).

Blood was sampled 5 min before onset of perfusion (T0) and 5, 30 and 180 min after onset of perfusion (T5, T30 and T180, respectively). Blood samples were analysed for multimeric profile via 1.4% SDS-agarose electrophoresis as described (18). Analysis of loss of HMW-multimers was measured and calculated as described (18).



## Results

### Selection of candidates inhibiting VWF-ADAMTS13 interactions

To select potential inhibitors of VWF proteolysis, we first tested candidate molecules in an immunosorbent assay assessing binding of ADAMTS13 to immobilised VWF in the presence of EDTA. In this assay, immobilised VWF is elongated and exposes its interactive sites for ADAMTS13, including those localised within the VWF A2 domain (8). Two distinct types of potential inhibitors were evaluated. First, the potential of several monomeric or dimeric VWF-derived fragments (C-terminally tagged with either the HPC4-recognition sequence or with Fc) to block VWF/ADAMTS13 interactions was tested (**Figure 1A**). When analysed at a concentration of 10 nM, the majority of them (D'D3-HPC4, A1-Fc, A3-Fc, A1A2A3-HPC4 and D4-Fc) exhibited minor inhibition ( $\approx 20\%$ ), whereas dimeric A2-Fc displayed substantial inhibition at this concentration ( $65 \pm 6\%$ ;  $n=5$ ;  $p<0.001$ ). We next assessed a panel of murine monoclonal antibodies (0.1 mg/ml) directed either against VWF or ADAMTS13 (**Figure 1B**). Control experiments showed that ADAMTS13 binding was markedly inhibited in the presence of polyclonal anti-VWF antibodies ( $75 \pm 9\%$ ;  $n=3$ ;  $p<0.0001$ ), whereas binding was unaffected in the presence of control mouse IgG. None of our three monoclonal anti-ADAMTS13 antibodies proved inhibitory (data not shown). Among the 29 monoclonal anti-VWF antibodies tested, 18 mAbs were unable to inhibit VWF-ADAMTS13 interactions, whereas 10 antibodies displayed mild inhibition ( $<15\%$ ). In Figure 1B, representative data for antibodies recognizing different VWF domains (D', A1, A2, A3) are depicted. The strongest inhibitor was antibody mAb508, which reduced binding of ADAMTS13 to VWF by  $46 \pm 14\%$  ( $n=5$ ;  $p<0.0001$ ). Taken together, these data identify the A2-Fc fragment and antibody mAb508 as potential inhibitors of the VWF-ADAMTS13 interaction.

### **mAb508 reduces vortex shear stress-induced VWF proteolysis**

Fluid shear stress plays a critical role in regulating ADAMTS13-mediated proteolytic cleavage of soluble VWF by ADAMTS13. Therefore, we tested the inhibitory effect of mAb508 (0.1 mg/ml) and A2-Fc (1  $\mu$ g/ml), under conditions of increased shear stress, using a vortex-based degradation assay (30). VWF degradation was monitored using densitometric integration of VWF cleavage products (140 and 176 kDa) obtained after immunoprecipitation and western-blot analysis. In our experimental conditions, proteolytic cleavage of pd-VWF (30  $\mu$ g/ml) by recombinant ADAMTS13 (3  $\mu$ g/ml) increases as a function of incubation time, with maximal degradation obtained after 30 min (**Figure 2A**). In subsequent experiments, we incubated for 60 min to ensure maximal degradation. Importantly, degradation of VWF by the metalloprotease ADAMTS13 was inhibited by the addition of the chelator EDTA (10mM) or polyclonal goat anti-human ADAMTS13 antibodies (residual proteolysis <10% compared to control; **Figure 2B**). Furthermore, no VWF proteolysis was observed in the absence of shear stress. Unexpectedly, VWF proteolysis was unaffected (residual proteolysis  $96 \pm 5\%$ ; n=3) by the addition of A2-Fc (1  $\mu$ g/ml), despite the notion that this fragment interferes with VWF-ADAMTS13 interactions under static conditions. In contrast, degradation of VWF was markedly reduced (residual proteolysis  $52 \pm 10\%$  compared to control; n=4;  $p < 0.0001$ ) in the presence of mAb508 (0.1 mg/ml). This indicates that the monoclonal anti-VWF antibody mAb508 is able to partially interfere with ADAMTS13-mediated proteolysis under conditions of increased shear stress.

### **The epitope for mAb508 is located in the VWF D4 domain**

To identify the epitope of mAb508, we first evaluated binding of the antibody to distinct VWF fragments in an immuno dot-blot assay, in which bound antibody was probed using peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-mouse antibodies (**Figure 3A**). As expected, mAb508 interacted with both r-VWF and pd-VWF that were used as positive controls. No signal was observed for HPC4-tagged constructs D'D3-HPC4 and A1A2A3-HPC4, whereas a weak signal was present for Fc-tagged variants A1-Fc, A2-Fc and A3-Fc. A similar weak signal was observed with a control Fc-fragment containing residues 1-685 of ADAMTS13, suggesting a minor cross-reaction of the anti-mouse IgG with human Fc fragments. Conversely, mAb508 strongly bound to two different fragments that contained the D4 sequence (VWF residues 1947-2301; **Figure 3A**), i.e. monomeric D4-HPC4 and dimeric D4-Fc. A similar specificity for VWF D4 domain was observed in an immuno-sorbent assay (**Figure 3B**). Indeed, no binding was observed with VWF fragments lacking the D4 domain, including a D4 domain-deleted VWF variant. In contrast, a strong positive signal was observed for the binding of mAb508 to pd-VWF and both D4 fragments (**Figure 3B**). Moreover, similar dose-response curves were observed for the binding of mAb508 to immobilized D4 fragments and pd-VWF, suggesting that the D4 domain contains the full epitope for mAb508 (**Figure 3C**). In order to define the mAb508 epitope in the VWF D4 domain, we next tested binding of the antibody to VWF fragments obtained via proteolysis by *Staphylococcus aureus* V-8 protease, which cleaves within the D4 domain between residues 2133 and 2134 (32). mAb508 reacted exclusively with the SPII fragment (residues 2134-2813) but not with the SPIII fragment (764-2133) (data not shown), narrowing the antibody's epitope to the distal part of the D4 domain, i.e. residues 2134-2301.

To obtain more detailed information on the epitope localisation, we used a series of nine biotinylated-peptides encompassing hydrophilic regions of the distal D4 domain. Using this approach, we observed that mAb508 bound to a single peptide covering residues 2158 to 2169 (**Figure 3D**). In conclusion, the epitope of mAb508 appears to be located within the VWF D4 domain, a region previously found to be of relevance for the VWF-ADAMTS13 interaction (6, 8).

### **mAb508 is a partial inhibitor of VWF-ADAMTS13 interactions**

To further characterise the mAb508-VWF interaction, the apparent binding affinity was determined. Interactions between mAb508 and globular full-length VWF were assessed via bio-layer interferometry analysis using Octet-QK-equipment. Increasing concentrations of purified pd-VWF (0 to 0.2 mg/ml) were incubated with mAb508 immobilised onto protein A-biosensor tips. A time- and dose-dependent association of pd-VWF to mAb508 was observed (**Figure 4A, inset**). In order to calculate the apparent affinity, responses at equilibrium ( $B_{max}$ ) were plotted versus VWF concentrations. Best fitting of the data was obtained using a model describing the interaction of a single class of binding sites (**Figure 4A**), which revealed a  $K_{D,app}$  of  $13 \pm 3 \mu\text{g/ml}$  (mean  $\pm$  SD), corresponding to  $52 \pm 11 \text{ nM}$  based on VWF monomer concentrations.

We next investigated the inhibitory potential of mAb508 for the VWF-ADAMTS13 interaction in a competitive VWF-ADAMTS13 inhibition binding assay. VWF was directly coated ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) into a microtitre plate and increasing concentrations of mAb508 (range: 0 to  $50 \mu\text{g/ml}$ ) were used as competitor of ADAMTS13 ( $4 \mu\text{g/ml}$ ).

A dose-dependent inhibition was observed (**Figure 4B**). mAb508 inhibited the binding of soluble ADAMTS13 to immobilised VWF with an estimated IC<sub>50</sub> of  $0.09 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ . Maximal inhibition was obtained using  $0.5 \mu\text{g/ml}$  of antibody and did not exceed 50% even when using antibody concentrations up to  $50 \mu\text{g/ml}$  (**Figure 4B**). In conclusion, mAb508 binds to VWF with moderate affinity, and its binding to VWF partially inhibits the interaction between VWF and ADAMTS13.

### **mAb508 leaves haemostatic potential of VWF unaffected**

We next tested if mAb508 modulates VWF function, and two different tests were performed. First, VWF-ristocetin cofactor (VWF:RCo) activity was determined in the presence or absence of antibody mAb508 ( $50 \mu\text{g/ml}$ ). A similar VWF:RCo activity was determined in the absence or presence of mAb508, when tested in plasma of three separate individuals ( $72.7 \pm 7\%$  vs  $71.0 \pm 10.6\%$ , respectively). Second, the effect of Ab508 on the haemostatic activity using the whole-blood platelet function analyser (PFA)-100 was assessed. The closure time of this test is highly dependent on functional VWF. No differences in PFA-100 closure times were observed, irrespective whether collagen/epinephrine (Col/Epi) or collagen/ADP (Col/ADP) cartridges were used. Closure times were: Col/Epi:  $139 \pm 29$  seconds [sec] vs  $131 \pm 72$  sec & Col/ADP:  $83 \pm 9$  sec vs  $83 \pm 4$  sec in the absence and presence of mAb508, respectively. This data indicate that mAb508 leaves VWF function unaffected.

### **mAb508 reduces shear stress-induced VWF proteolysis under conditions of flow**

To evaluate whether mAb508 could represent a potential tool to inhibit degradation of HMW-multimers in patients with VAD, we used an ex vivo perfusion system incorporating the circulatory support pump Heartmate II®. Perfusion of citrated whole blood using this device results in a time-dependent loss of HMWmultimers (defined as >15 bands; **Figure 5A**), a phenomenon also observed in patients carrying this device (19). Densitometric analysis revealed a 50% loss of HMW-multimers was observed at 5 min after initiation of the perfusion, and a >95% loss of HMWmultimers occurred after 3 h of perfusion (**Figure 5A-D**). In the presence of the chelator EDTA, HMW-multimers remained stable, with only a marginal loss ( $7 \pm 3\%$ ) observed after 3 h of perfusion under pathological high shear stress (**Figure 5B**). Using increasing concentrations of mAb508 (range: 0.5-50  $\mu\text{g/ml}$ ; n=3 for each concentration), a dose-dependent mAb-based inhibition of VWF proteolysis was observed at each of the time points analysed (**Figure 5A and B**). Representative densitometric scans of multimer patterns at time points 0 and 3 h for the control and 3 h for mAb508 (0.5 and 10  $\mu\text{g/ml}$ ) are presented in **Figure 5C and D**. A similar extent of inhibition was observed for antibody concentrations of 10 and 50  $\mu\text{g/ml}$ , indicating that maximal inhibition was achieved at 10  $\mu\text{g/ml}$ . Importantly, inhibition was partial in both cases, as a 20% loss of HMW-multimers was detected after 3 h perfusion for each of these antibody concentrations (**Figure 5B**), consistent with the partial inhibitory potential of mAb508 in the binding experiments.

We considered the possibility that the kinetics of ADAMTS13-mediated VWF degradation or the action of mAb508 could be modulated by the use of citrate as an anticoagulant. Therefore, similar perfusion experiments were performed using blood that was heparin-anticoagulated (5.7 U unfractionated heparin/ml blood, corresponding to a dose of 400 U/kg bodyweight assuming 70 ml blood/kg bodyweight). As presented in **Figure 5E**, the kinetics of VWF degradation in heparin-anticoagulated blood was similar to that in citrate-anticoagulated blood. In addition, Mab508 (10  $\mu$ g/ml) inhibited VWF degradation to a similar extent in heparin- and citrate-anticoagulated blood, indicating that its mode of action is independent of the anticoagulant used.

In conclusion, our findings describe the identification of antibody mAb508 as a partial inhibitor of ADAMTS13-mediated degradation of VWF, preventing excessive VWF proteolysis in whole blood under flowing conditions.

## Discussion

Bleeding secondary to increased VWF degradation is currently the leading complication in patients undergoing left ventricular assist device (LVAD) support (33) and points to an emerging medical need for a treatment preventing proteolysis of VWF. The most likely candidate responsible for shear stress-induced VWF degradation is ADAMTS13, although a contribution of other proteases cannot be fully excluded (34). Given that a lack of ADAMTS13 activity is associated with TTP, it is further important to consider that blocking VWF proteolysis should be incomplete in order to avoid TTP-like complications.

In search for proteolysis inhibitors, we evaluated distinct candidates aiming to disrupt binding of ADAMTS13 to the VWF A2 or D4 domain, two interactive sites necessary to allow VWF proteolysis (6). Among these candidates, one mAb targeting the VWF D4 domain was identified to combine the desired properties of a potential therapeutic candidate, as it partially inhibited VWF-ADAMTS13 binding and reduced but not fully inhibited loss of HMW multimers under conditions of high shear stress. As expected, our screening of inhibitors of ADAMTS13-mediated proteolysis revealed that a recombinant A2-Fc variant was efficient in interfering with VWF-ADAMTS13 binding, achieving 65% inhibition while a two-fold molar excess of ADAMTS13 over A2-Fc was present (**Figure 1**). This inhibitory action fits with the localisation of the Tyr1605-Met1606 scissile bond and additional interactive sites within the VWF A2-domain. The exposure of these A2-domain interactive sites is shear stress-dependent for full-length VWF, but appears to be constitutive for the tested A2-Fc fragment. However, A2-Fc (used at a concentration of 1 µg/ml, corresponding to 10 nM) was unable to prevent VWF degradation under conditions of increased shear stress, suggesting that the scissile bond within the A2-Fc fragment is rapidly cleaved under these conditions thereby



reducing the inhibitory potential of this fragment (**Figure 2**). Indeed, it has previously been reported that peptides overlapping the C-terminal part of VWF A2 domain interfere with VWF proteolysis at micromolar concentrations, indicating that such fragments are relatively weak inhibitors (35). Additional experiments would therefore be needed to test the inhibitory effect of A2-Fc at higher concentrations. An alternative approach could be to block A2 domain-ADAMTS13 interactions using anti-A2 domain antibodies, as was described elsewhere (36) or antibodies targeting ADAMTS13 epitopes that overlap the A2-interactive site, including the ADAMTS13 spacer domain. However, this ADAMTS13 spacer domain contains the core antigenic epitope of anti-ADAMTS13 auto-antibodies known to be associated with acquired autoimmune TTP (37, 38). Hence, such approach might be associated with an increased risk of drug-induced TTP.

Besides the VWF A2 domain, the VWF D4 domain is also an attractive target to block ADAMTS13-mediated proteolysis. Indeed, the VWF D4 domain contains an exosite accessible on globular VWF, mediating the initial step in the association between VWF and ADAMTS13 (8, 9). However, opposite to the A2-Fc fragment, no inhibition of VWF-ADAMTS13 binding was observed using a D4-Fc fragment (**Figure 1**). We considered the possibility that D4-Fc was folded incorrectly. However, D4-Fc displayed similar binding as full-length VWF to three distinct anti VWF D4-domain Abs (**Figure 3** & data not shown), indicating that its folding was within the normal range. More likely, D4-Fc is simply inefficient in its interaction with ADAMTS13. This possibility is consistent with the low affinity ( $K_{D,app} = 0.7 \mu\text{M}$ ) that was previously reported for the interaction between the isolated VWF D4 domain and ADAMTS13 (8).

Unlike the D4-Fc fragment, binding was efficiently inhibited in the presence of a murine mAb directed against VWF D4 domain (designated as mAb508). The epitope for mAb508 is localised between residues 2134 and 2301 and seems to involve the sequence 2158-2169 (**Figure 3**). mAb508 binds the VWF D4 domain with a moderate affinity ( $KD_{app} = 52 \text{ nM}$ ; **Figure 4A**). This value should be considered as an estimate in view of the multimeric structure of VWF and the dimeric nature of the mAb, which complicate an accurate assessment of the true affinity constant. Despite its moderate affinity, mAb508 was particularly efficient to block VWF-ADAMTS13 binding under the conditions employed. Additional experiments are needed to reveal the nature of the inhibitory mechanism, whether inhibition is allosteric or involves direct competition for overlapping binding sites.

In order to assess the clinical potency of the use of anti-D4 domain antibodies to prevent excessive VWF degradation under LVAD support, we implemented a novel LVAD-perfusion model (**Figure 5**). This model faithfully mimics the clinical setting, since all experiments are performed in citrated whole blood in the presence of physiological concentrations of VWF and ADAMTS13. Furthermore, unlike vortex-based degradation assays (30), there is no volume limitation allowing more flexibility with regard to spiking experiments with inhibitors and allowing time-course studies with several blood samplings. Using this LVAD-based perfusion model, a dose-dependent inhibition of HMW-multimer degradation was obtained with mAb508, consistent with the marked inhibition obtained in the vortex-based degradation assay (**Figure 2 & Figure 5**). Antibody mAb508 shares its specificity for the D4 domain with antibody RU8, which was recently reported to interfere with ADAMTS13-mediated degradation of VWF in a vortex-based degradation assay (8).

However, degradation of HMW-multimers was fully repressed in the presence of 25 µg/ml of antibody RU8, whereas residual VWF proteolysis was still detectable at mAb508 concentrations of 45 µg/ml, indicating fundamental differences in their mode of action. The inability of mAb508 to fully inhibit VWF proteolysis, even in the presence of a vast molar excess, not only fits the requirement for partial inhibition in order to avoid TTP-like symptoms, but also allows for a wide therapeutic window.

In conclusion, we provide an *ex vivo* proof-of-concept for an antibody-based therapy for the treatment of VWF degradation induced by circulatory assist devices. Such antibody-based treatment could be of benefit not only in VAD, but also in other pathologies characterised by increased VWF proteolysis like aortic stenosis or hypertrophic obstructive cardiomyopathy complicated by Heyde syndrome (18, 39), VWD-type 2A (40), essential thrombocytemia (41) or extracorporeal membrane oxygenation support (42). Additional studies including humanisation of mAb508 and extensive pre-clinical studies to evaluate the *in vivo* efficacy and safety of this approach are warranted to further assess its therapeutic potential. One issue that requires particular attention concerns the combination of this antibody-based approach in combination with the anticoagulant used by the patient. Often, patients carrying LVADs are given vitamin K-antagonists and/or heparin (rather than direct thrombin- or factor Xa-inhibitors). Combining anti-VWF antibodies with these anticoagulants could potentially increase the bleeding risk in these patients. However, our analyses demonstrated that antibody mAb508 leaves VWF function unaffected (as determined in VWF:RC<sub>0</sub> and PFA-100 assays). Moreover, the action of mAb508 was independent of the anticoagulant used, suggesting that the antibody could be used in combination with current anticoagulants without increasing the bleeding risk.

**Conflicts of interest:** None declared

### **What is known about this topic?**

- It is known that patients carrying circulatory assist devices have an increased risk of bleeding due to dysfunctional VWF.
- These devices induce high shear stress-conditions, favouring ADAMTS13-mediated degradation of VWF.

### **What does this paper add?**

- We describe monoclonal anti-VWF antibody mAb508, which is directed against the VWF D4-domain.
- mAb508 prevents excessive VWF degradation in a HeartMateII whole blood-perfusion model.
- Our results may provide the basis for an antibody-based therapy to prevent VWF-dependent bleeding episodes in patients carrying circulatory assist devices.

### **Références**

1. Zhou YF, Eng ET, Zhu J, et al. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood* 2012; 120: 449-458.
2. Sadler JE. von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1): 24-27.
3. Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, et al. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood* 2011; 117: 5033-5043.
4. Groot E, Fijnheer R, Sebastian SA, et al. The active conformation of von Willebrand factor in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura in remission. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 962-969.
5. De Ceunynck K, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K. Unwinding the von Willebrand factor strings puzzle. *Blood* 2013; 121: 270-277.
6. Crawley JT, de Groot R, Xiang Y, et al. Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2011; 118:3212-3221.
7. Gao W, Anderson PJ, Majerus EM, et al. Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 19099-19104.
8. Zanardelli S, Chion AC, Groot E, et al. A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood* 2009; 114:2819-2828.
9. Feys HB, Anderson PJ, Vanhoorelbeke K, et al. Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 2088-2095.

10. Xiang Y, de Groot R, Crawley JT, et al. Mechanism of von Willebrand factor scissile bond cleavage by a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 (ADAMTS13). *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108: 11602-11607.
11. Tsai HM. von Willebrand factor, shear stress, and ADAMTS13 in haemostasis and thrombosis. *ASAIO J* 2012; 58: 163-169.
12. Dong JF, Moake JL, Nolasco L, et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 2002; 100: 4033-4039.
13. De Ceunynck K, Rocha S, Feys HB, et al. Local elongation of endothelial cell-anchored von Willebrand factor strings precedes ADAMTS13 protein-mediated proteolysis. *J Biol Chem* 2011; 286: 36361-36367.
14. Shim K, Anderson PJ, Tuley EA, et al. Platelet-VWF complexes are preferred substrates of ADAMTS13 under fluid shear stress. *Blood* 2008; 111: 651-657.
15. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001; 413:488-494.
16. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2103-2114.
17. Warkentin TE, Moore JC, Morgan DG. Aortic stenosis and bleeding gastrointestinal angiodysplasia: is acquired von Willebrand's disease the link? *Lancet* 1992; 340: 35-37.
18. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, et al. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N Engl J Med* 2003; 349: 343-349.
19. Geisen U, Heilmann C, Beyersdorf F, et al. Non-surgical bleeding in patients with ventricular assist devices could be explained by acquired von Willebrand disease. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008; 33: 679-684.
20. Uriel N, Pak SW, Jorde UP, et al. Acquired von Willebrand syndrome after continuous-flow mechanical device support contributes to a high prevalence of bleeding during long-term support and at the time of transplantation. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 1207-1213.
21. Crow S, John R, Boyle A, et al. Gastrointestinal bleeding rates in recipients of nonpulsatile and pulsatile left ventricular assist devices. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 137: 208-215.
22. Pareti FI, Lattuada A, Bressi C, et al. Proteolysis of von Willebrand factor and shear stress-induced platelet aggregation in patients with aortic valve stenosis. *Circulation* 2000; 102: 1290-1295.
23. Meyer AL, Malehsa D, Bara C, et al. Acquired von Willebrand syndrome in patients with an axial flow left ventricular assist device. *Circ Heart Fail* 2010; 3:675-681.
24. Thompson JL, 3rd, Schaff HV, Dearani JA, et al. Risk of recurrent gastrointestinal bleeding after aortic valve replacement in patients with Heyde syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012; 144: 112-116.
25. Lenting PJ, Westein E, Terraube V, et al. An experimental model to study the in vivo survival of von Willebrand factor. Basic aspects and application to the R1205H mutation. *J Biol Chem* 2004; 279: 12102-12109.
26. Pegon JN, Kurdi M, Casari C, et al. Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica* 2012; 97:1855-1863.
27. Meyer D, Zimmerman TS, Obert B, et al. Hybridoma antibodies to human von Willebrand factor. I. Characterisation of seven clones. *Br J Haematol* 1984; 57:597-608.
28. Meyer D, Baumgartner HR, Edginton TS. Hybridoma antibodies to human von Willebrand factor. II. Relative role of intramolecular loci in mediation of platelet adhesion to the subendothelium. *Br J Haematol* 1984; 57: 609-620.

29. Rayes J, Hommais A, Legendre P, et al. Effect of von Willebrand disease type 2B and type 2M mutations on the susceptibility of von Willebrand factor to ADAMTS-13. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 321-328.
30. Han Y, Xiao J, Falls E, et al. A shear-based assay for assessing plasma ADAMTS13 activity and inhibitors in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion* 2011; 51: 1580-1591.
31. Frazier OH, Delgado RM, 3rd, Kar B, et al. First clinical use of the redesigned HeartMate II left ventricular assist system in the United States: a case report. *Tex Heart Inst J* 2004; 31: 157-159.
32. Layet S, Girma JP, Obert B, et al. Evidence that a secondary binding and protecting site for factor VIII on von Willebrand factor is highly unlikely. *Biochem J* 1992; 282: 129-137.
33. Eckman PM, John R. Bleeding and thrombosis in patients with continuous-flow ventricular assist devices. *Circulation* 2012; 125: 3038-3047.
34. Lancellotti S, Basso M, De Cristofaro R. Proteolytic Processing of Von Willebrand Factor by Adamts13 and Leukocyte Proteases. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013; 5: e2013058.
35. Wu JJ, Fujikawa K, McMullen BA, et al. Characterisation of a core binding site for ADAMTS-13 in the A2 domain of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 18470-18474.
36. Zhang J, Ma Z, Dong N, et al. A conformation-sensitive monoclonal antibody against the A2 domain of von Willebrand factor reduces its proteolysis by ADAMTS13. *PLoS One* 2011; 6: e22157.
37. Klaus C, Plaimauer B, Studt JD, et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004; 103:4514-4519.
38. Luken BM, Turenhout EA, Hulstein JJ, et al. The spacer domain of ADAMTS13 contains a major binding site for antibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 2005; 93: 267-274.
39. Blackshear JL, Schaff HV, Ommen SR, et al. Hypertrophic obstructive cardiomyopathy, bleeding history, and acquired von Willebrand syndrome: response to septal myectomy. *Mayo Clin Proc* 2011; 86: 219-224.
40. Favaloro EJ, Bonar R, Marsden K. Different bleeding risk in type 2A and 2M von Willebrand disease: a 2-year prospective study in 107 patients: a rebuttal. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1455-1458.
41. Rolf N, Suttorp M, Budde U, et al. Essential thrombocythaemia in a teenage girl resulting in acquired von Willebrand syndrome with joint haemorrhage and menorrhagia. *Thromb Haemost* 2010; 103: 1272-1274.
42. Heilmann C, Geisen U, Beyersdorf F, et al. Acquired von Willebrand syndrome in patients with extracorporeal life support (ECLS). *Intensive Care Med* 2012; 38: 62-68.

## Figure legends

### Figure 1: Screening for competitive inhibitors of VWF-ADAMTS13 binding.

Candidate inhibitors were tested in an immuno-sorbent assay evaluating the binding of V5-tagged wt-rADAMTS13 (3 µg/ml) to immobilized pd-VWF (2 µg/ml) in the presence of EDTA (10 mM). A) Fc- or HPC4-tagged VWF fragments (10 nM) were incubated for 30 min at 37°C with wt-rADAMTS13 before addition to immobilised full-length VWF in microtitre wells for 3 h. Bound ADAMTS13 was probed using a peroxidase-labelled monoclonal anti-V5 tag antibody for 2 h at 37°C and detected via peroxidase-mediated hydrolysis of TMB. B) mAbs targeting VWF was evaluated for their effect on ADAMTS13 binding to VWF as described for panel A using polyclonal antibodies as negative (mouse IgG) and positive (rabbit anti-VWF IgG) controls (all antibodies were tested at a concentration of 0.1 mg/ml). Data represent the mean ± SD of 3–5 experiments and are expressed as residual ADAMTS13 binding compared to incubation in the absence of VWF- fragments or antibodies for panel A and B, respectively. For panel B, data representing antibodies recognising different VWF domains (D', A1, A2, A3) are depicted. \*\*\*:  $p < 0.0001$  as calculated via one-way ANOVA with Dunnett-multiple comparison test.

### Figure 2: Functional evaluation of mAb508 and A2-Fc in a vortex-based degradation assay.

A) pd-VWF (30 µg/ml), wt-rADAMTS13 (3 µg/ml) and Pefabloc (2.5 mM) were incubated in a volume of 40 µl and exposed to constant vortexing (Vortex Genie 2T; 2500 rpm) for different periods of time (5–60 min). As a control, a 60-min incubation under vortexing was performed in the presence of EDTA (10 mM). VWF degradation was assessed via Western blot analysis. Panel A represents a typical experiment showing time-dependent degradation of VWF. B) pd-VWF, wt-rADAMTS13 and Pefabloc were exposed to constant vortexing for 60 min as described under panel A in the absence or presence of one the following components: EDTA (10mM), polyclonal anti-ADAMTS13 antibodies (50 µg/ml), A2-Fc (1 µg/ml) or mAb508 (0.1 mg/ml). VWF and ADAMTS13 were also incubated for 60 min in the absence of vortexing (no shear). VWF degradation was semi-quantified via integration of immunoprecipitated VWF degradation bands (140 & 176 kDa) using ImageJ software. Data represent mean ± SD of four experiments and are expressed as percentage VWF degradation. Degradation after 60 min vortexing in the absence of additional components added was set at

100%. \*\*\*:  $p < 0.0001$  as calculated via one-way ANOVA with Dunnett-multiple comparison test.

**Figure 3: mAb508 interacts with D4 domain of VWF.**

Panel A: Purified proteins (all 10 nM) were immobilised onto a blotting membrane and incubated with mAb508 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) for 16 h at room temperature. Bound mAb508 was probed with peroxidase-labelled goat-anti-mouse antibodies and detected via luminal-based enhanced chemiluminescence. B and C) Purified proteins (10 nM) were immobilised onto microtitre wells for 16 h at 4°C. After washing, wells were incubated with mAb508 (B: 5  $\mu\text{g/ml}$ ; C: 0.5 ng/ml-50  $\mu\text{g/ml}$ ) or an isotype mouse IgG control (B: 5  $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 h at 37°C. Bound antibodies were probed using peroxidase-labelled polyclonal goat antimouse IgG antibodies and detected via peroxidase-mediated TMB hydrolysis. D) Biotinylated-peptides were immobilised onto streptavidin-coated microtitre wells and incubated with mAb508 or isotype mouse IgG (both 5  $\mu\text{g/ml}$ ). Bound antibodies were probed and detected as described for panels B and C. Data in panels B and D represent mean  $\pm$  SD of 3–5 experiments. For panel C, data from a single experiment are shown.

**Figure 4: Biochemical analysis of VWF-mAb508 interaction.**

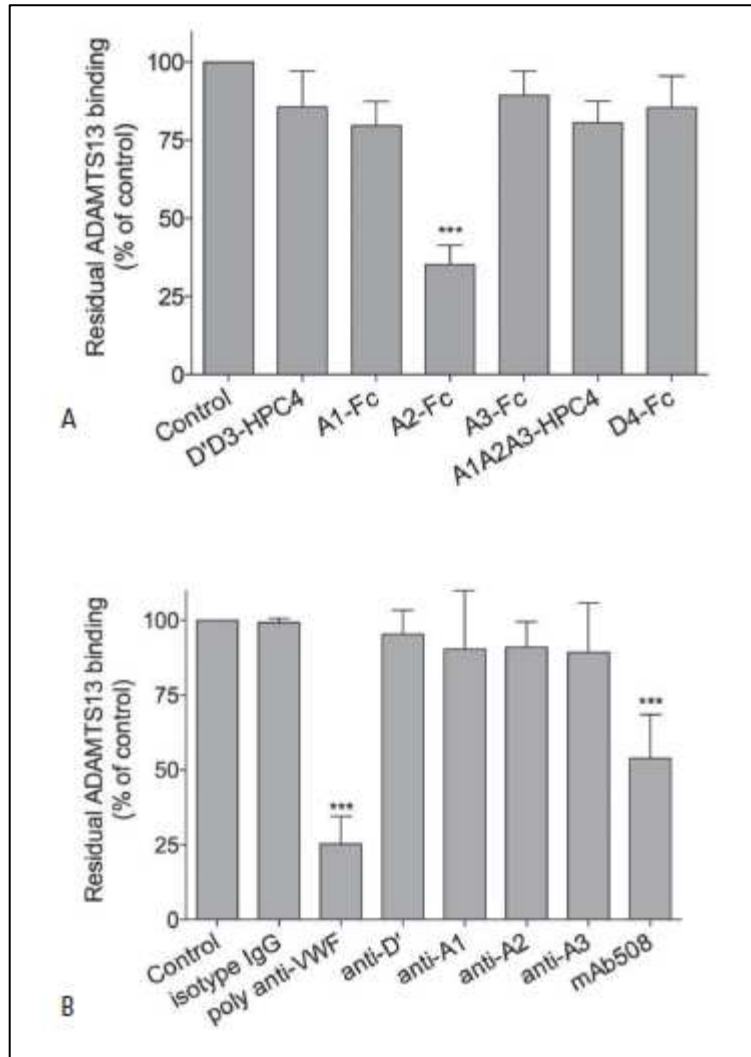
A) Protein A-coated biosensors were saturated with mAb508 (0.5 mg/ml) during a 7 min incubation using Octet-QK equipment. Subsequently, biosensors were incubated with various concentrations purified pd-VWF (0–0.2 mg/ml) and association of VWF was monitored real-time for a 10-min period until equilibrium was reached. Data represent mean  $\pm$  SD of four independent associations and depicted are the calculated responses (shift in nm) at equilibrium versus VWF concentration. The drawn line represents the best fit using a model describing the interaction of a single class of binding sites. Inset panel A: representative association curves of different concentrations of VWF. B) Binding of ADAMTS13 to immobilised VWF was performed as described for Figure 1 in the absence or presence of various concentrations mAb508 (0.05 ng/ml – 50  $\mu\text{g/ml}$ ). Data represent the mean  $\pm$  SD of four experiments and are expressed as % of residual ADAMTS13 binding compared to the absence of mAb508. Drawn line represents the best fit using a sigmoidal dose-response.



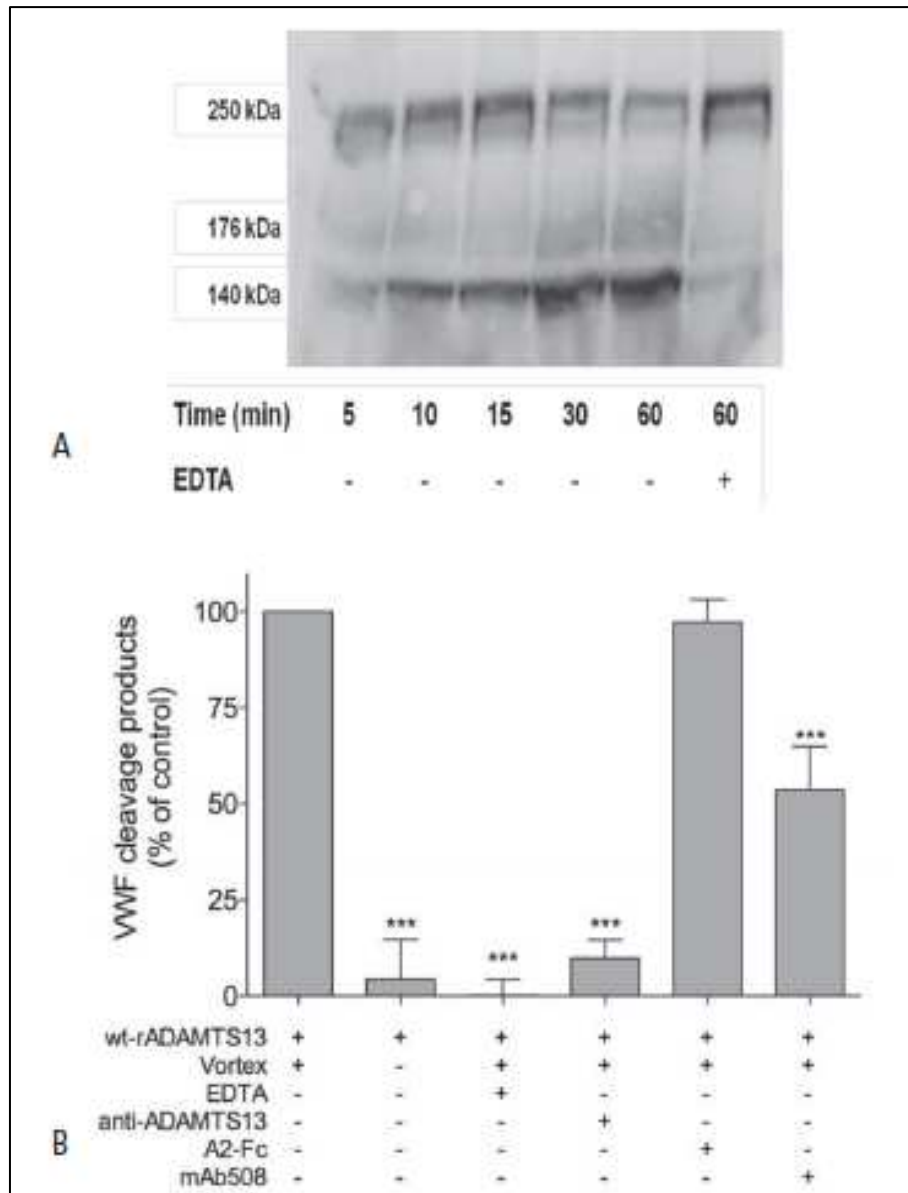
**Figure 5: Evaluation of mAb508 on shear-induced VWF proteolysis in flowing blood.**

Citrated whole human blood (200 ml) was perfused in an ex-vivo perfusion system incorporating a HeartMateII® pump. The pump rotor was set to 9000 rpm. Perfusions were performed in the absence (closed black circles) or presence of EDTA (10 mM; closed black squares) or various concentrations of mAb508 (0.5 µg/ml, grey circles; 2 µg/ml grey squares; 10 µg/ml, grey triangles up; 50 µg/ml, grey triangles down). Samples were taken 5 min before the onset of perfusion (T0) and after 5 min (T5), 30 min (T30) or 180 min (T180). Samples were subsequently tested for multimer patterns via 1.4% SDS-agarose electrophoresis and the presence of HMW-multimers (>15-mers) was determined. A) Representative multimer pattern of samples taken in the absence or presence of mAb508 (10 µg/ml). Normal plasma (NP) is added as reference. B) Presence of HMW-multimers (percentage of HMW-multimers compared to T0, which was set at 100%) as a function of time. C, D) Overlays obtained by densitometric scanning of VWF multimeric patterns showing the relative amount of HMW-multimers (>15 bands) at T180 vs T0. Presented patterns in the absence of mAb508 (blue line: T180 Ctl) or in the presence of mAb508 (black line: T0 and red line: T180 mAb) either at 0.5 µg/ml (C) or 10 µg/ml (D). E) Representative multimer pattern of samples taken during perfusion of heparin-anticoagulated blood (5.7 U unfractionated heparin/ml blood) in the absence or presence of mAb508 (10 µg/ml). Normal plasma (NP) is added as reference.

Figure 1



**Figure 2**



**Figure 3**

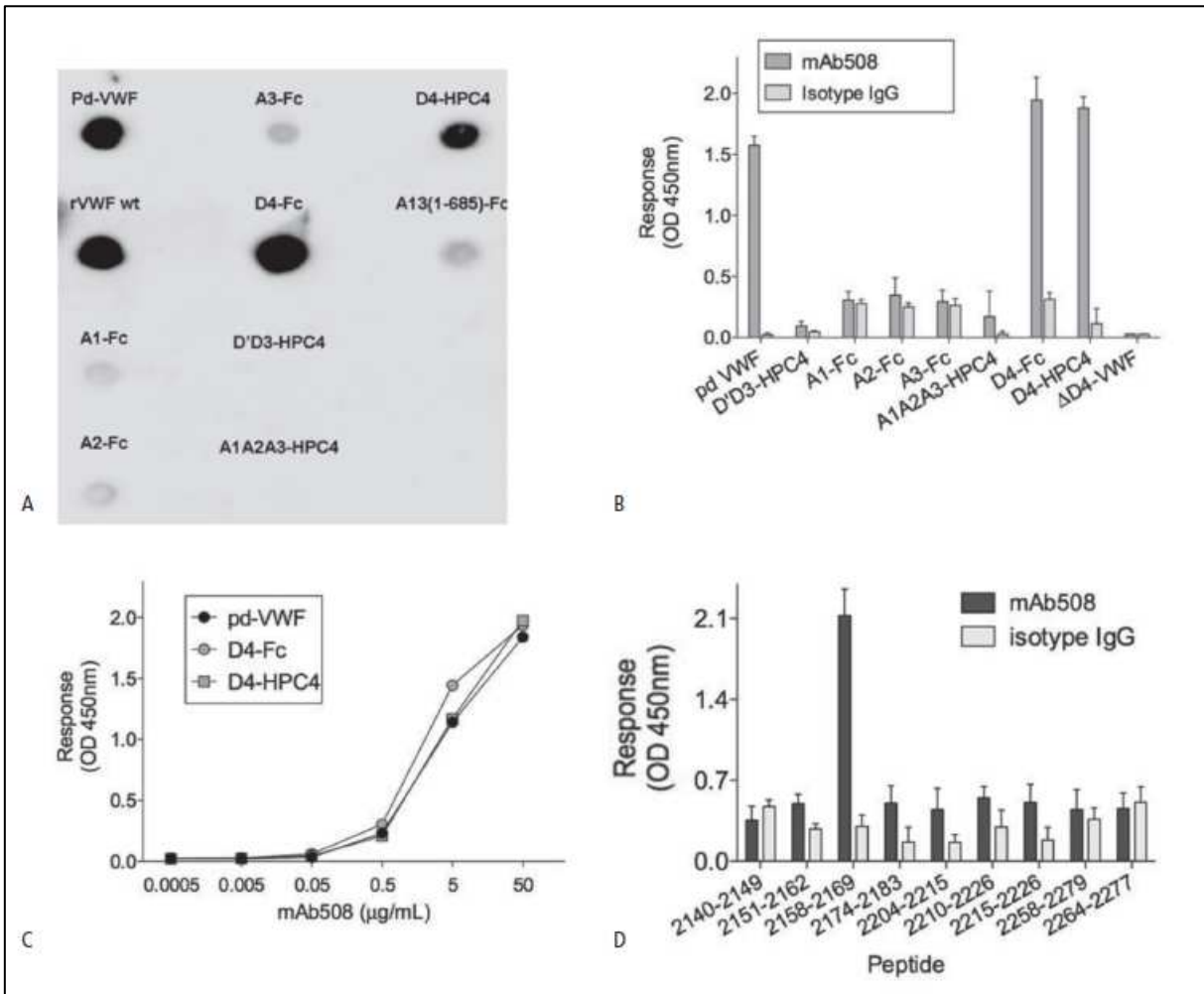


Figure 4

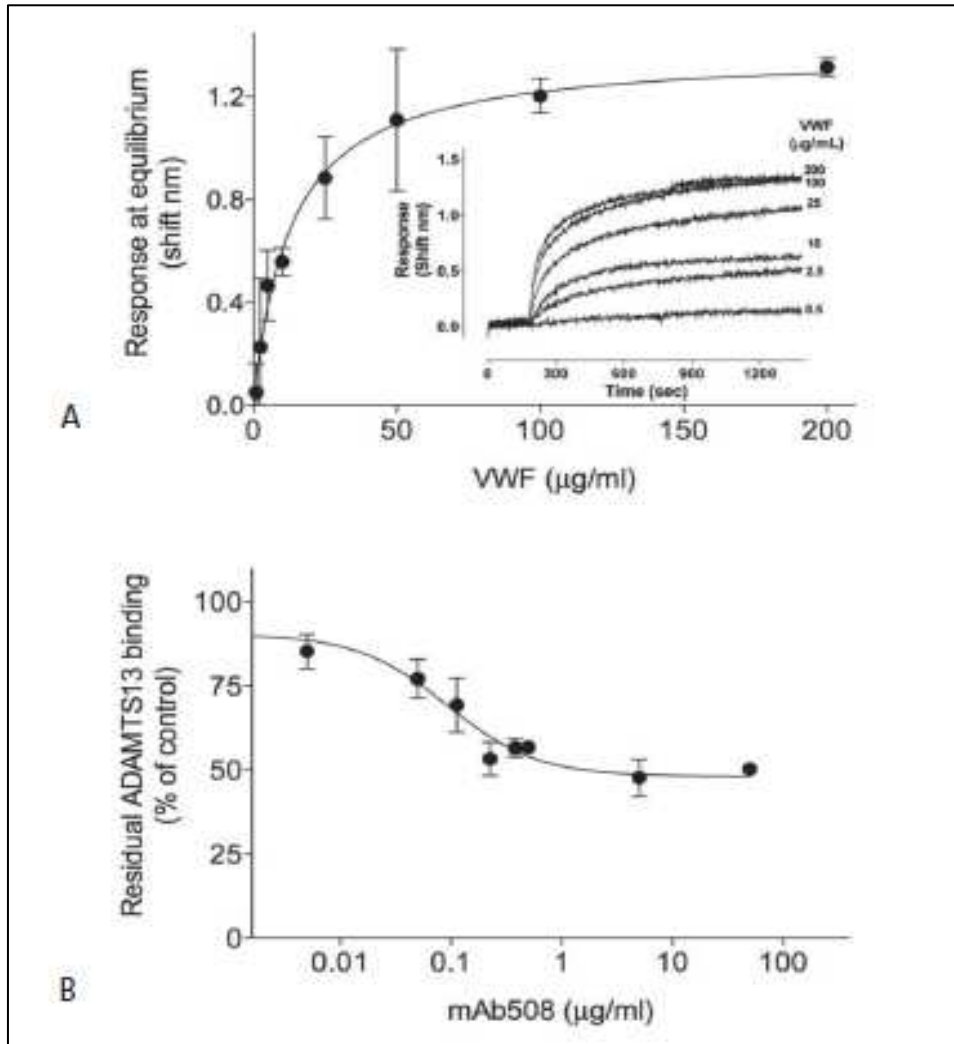
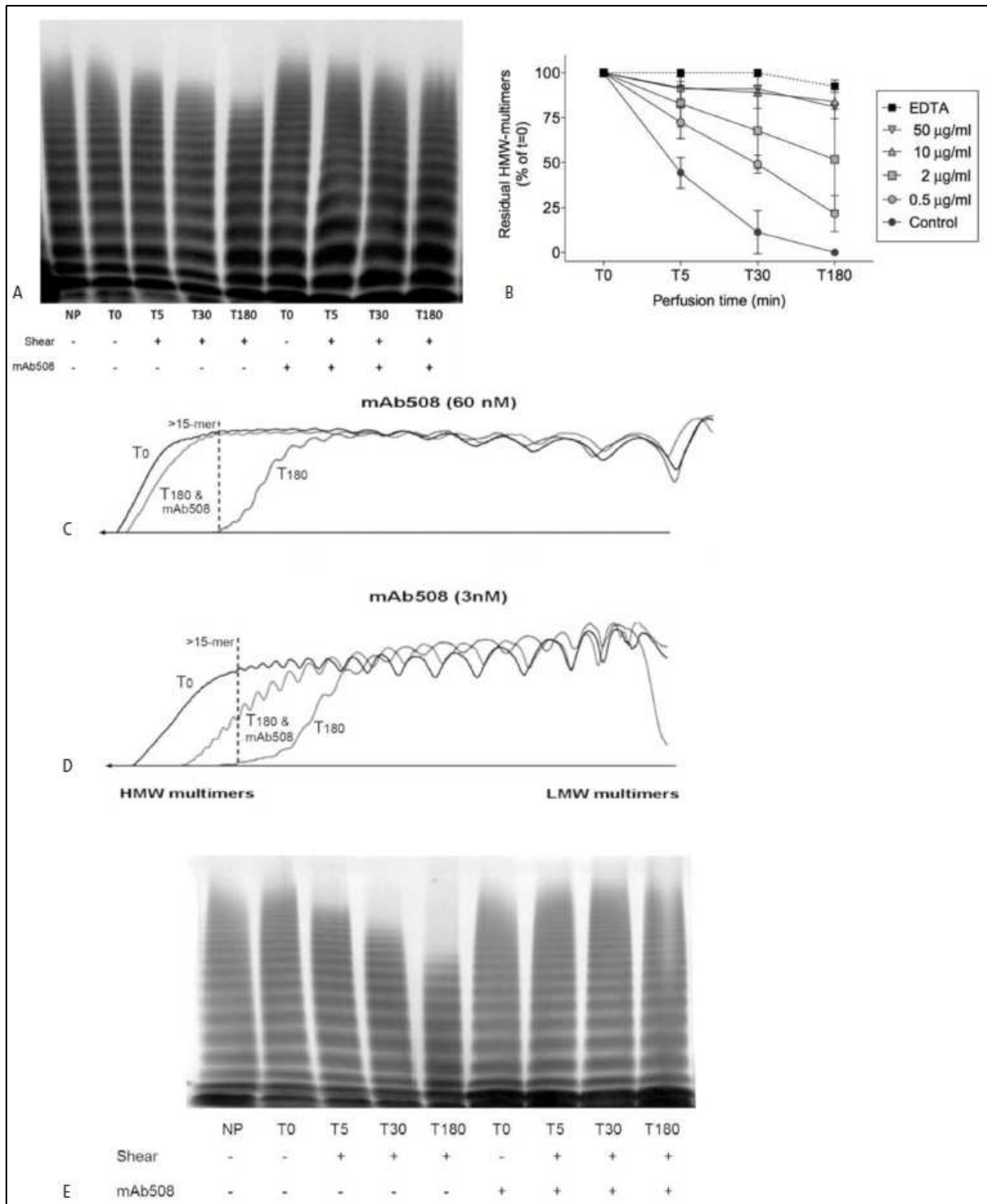


Figure 5



**CHAPITRE 3 : Développement et évaluation d'un nouveau test ELISA pour le diagnostic des formes de maladie de Willebrand associées à un excès de protéolyse du VWF**

**Article non soumis:** ELISA-based diagnosis of VWF disorders associated to increased VWF proteolysis

Un excès de protéolyse du VWF caractérise la VWD constitutionnelle de type 2A (IIA) et semble également en cause dans les VWD acquises associées au Rao, aux ACM-FC ou aux syndromes myélo-prolifératifs. Il en résulte une perte des VWF-HPM qui peut actuellement être mise en évidence par électrophorèse. Cet examen occupe ainsi une place centrale dans le typage de la VWD constitutionnelle, notamment pour la distinction entre VWD de type 2A et VWD de type 2M. L'électrophorèse est également considérée actuellement comme l'examen de référence pour le diagnostic des formes de VWD acquises associées à un excès de protéolyse du VWF. Cet examen biologique comporte néanmoins des inconvénients (caractère chronophage, expertise technique) qui limitent sa réalisation à de rares laboratoires spécialisés et qui sont incompatibles avec une urgence diagnostique et thérapeutique.

Nous avons ainsi souhaité développer un test ELISA permettant une quantification plus rapide et simplifiée de la protéolyse du VWF. Nous avons procédé à l'évaluation de cet ELISA dans trois conditions : 1) à partir d'un modèle d'ACM-FC *in-vitro*, 2) dans une cohorte de patients avec une VWD constitutionnelle, ayant fait l'objet d'une étude phénotypique et génotypique exhaustive par le Centre de Référence de la Maladie de Willebrand, CRMW), 3) dans une cohorte de patients avec une VWD acquise en lien avec une ACM-FC, un Rao ou une gammopathie monoclonale de signification indéterminée. Cette étude démontre que ce test pourrait constituer une alternative intéressante à l'électrophorèse pour les formes acquises ou constitutionnelles de VWD associées à un excès de protéolyse du VWF.



## **ELISA-based diagnosis of VWF disorders associated to increased VWF proteolysis**

### **Correspondence:**

Sophie Susen  
Centre de Biologie Pathologie  
Centre Hospitalier Régional  
59037 Lille Cedex  
France  
Tel:+33-(0)3-20-44-59-37  
Fax:+33-(0)3-20-44-69-89  
E-mail: sophiesusen@aol.com

**Brief title:** ELISA-based diagnosis of excess of proteolysis of VWF

**Key words:** Von Willebrand disease, acquired von Willebrand syndrome, proteolysis, aortic stenosis, circulatory support device.

## **Abstract**

### **Background**

Von Willebrand disease-type 2A (VWD-2A) and acquired von Willebrand syndrome (AVWS) secondary to aortic stenosis (AS) or left ventricular assist support (LVAD) are associated with an increased proteolysis of VWF. Electrophoresis-based assays represent currently the most sensitive tools to assess such increased VWF proteolysis. However they have several drawbacks impeding their large diffusion among routine diagnosis laboratories. An early diagnosis especially of aVWS may thus result challenging and differ appropriate medical care. We provide herein a new ELISA aiming an easier diagnosis of increased proteolysis of VWF in VWF disorders.

### **Patients and methods**

Our ELISA was assessed successively in an *ex-vivo* LVAD-model, in VWD-patients (detail n=89; detail: VWD-2A(IIA), n=30; VWD-2B, n=25; VWD-2A(III), n=20; VWD-2M, n=14) and in AVWS-patients (including AS-patients, n=11; LVAD-patients, n=9; and MGUS-patients, n=7). VWF proteolysis rate (mean±SD) was expressed as a relative percentage with a standard of VWF proteolysis specifically developed for this purpose.

### **Results**

A speed-dependent increase of VWF proteolysis was assessed in the LVAD model. In VWD-patients, VWF proteolysis was significantly increased in VWD-2A(IIA) and VWD-2B and significantly decreased in VWD-2A(III) versus controls ( $p<0.0001$ ). In AVWS-patients, VWF proteolysis was significantly increased in AS- and LVAD-patients compared to controls ( $p<0.0001$ ) and no detectable in MGUS-patients. A significant increase of VWF proteolysis was detected as soon as three hours after LVAD implantation ( $p<0.01$ ).

### **Conclusion**

Our ELISA provides a rapid and accurate diagnosis tool of increased VWF proteolysis. It Such assay might represent a helpful alternative to electrophoresis-based assays in the diagnosis and management of constitutive or acquired VWD due to increased VWF proteolysis.

## Introduction

An easy and rapid diagnosis of the subtype and of the underlying mechanisms of von Willebrand disease type 2A (VWD-2A) and acquired von Willebrand syndrome (AVWS) remains often an unmet clinical need. In most cases of VWD-2A and of AVWS associated with aortic stenosis (AS) or left ventricular assist device (LVAD) therapy, increased VWF proteolysis is a central pathogenic mechanism and is associated with a loss of high molecular weight multimers (HMW-multimers) <sup>[1][2][3][4]</sup>.

Currently the diagnosis of VWD-2A and AVWS associated with cardiovascular disorders is based on electrophoresis assays <sup>[5, 6]</sup>. Such electrophoresis assays are essential to differentiate VWD-2A and VWD-2M subtypes. These assays are however very difficult to implement in “routine” as they need to be performed in small batches by dedicated technicians specifically trained to these techniques. It makes VWD typing a cumbersome process and the use of these diagnosis methods is of little help when a rapid clinical decision is needed. In patients with LVAD support, AVWS is frequently (but inconstantly) observed depending on the device implanted <sup>[7, 8]</sup> and is one of the main cause of severe bleeding occurring in this high-risk population. In case of such bleeding complications, strategies based on the reduction of the speed of the LVAD rotor and/or the injection of VWF can be applied <sup>[9, 10]</sup>. These strategies are however at potential risk for the patients (hemodynamic instability, thrombosis) and must be considered only once the diagnosis of AVWS is confirmed.

In this context we thought to develop a rapid, reproducible and quantitative method of VWF-proteolysis. Our purpose was 1) to develop a rapid and quantitative ELISA-based diagnosis of excess of VWF-proteolysis; 2) to evaluate the ability of this method to reliably recognize different forms of constitutive or acquired VWD (with or without excess of proteolysis).

## **Material and Methods**

### **Patients**

The rate of VWF proteolysis was studied with our ELISA in patients with VWD or AVWS associated or not with an increase in VWF proteolysis.

### **Patients with VWD**

VWD patients associated with an increase (2A (IIA), n=30; and 2B, n=25 variants), an unmodified (2M, n=14 variants) or a decrease (2A (IIE), n=20 variants) in VWF proteolysis<sup>[1]</sup> were selected from the French cohort multicentric database CRMW. All patients gave a written informed consent. Specific mutations were identified in all patients (supplementary data Table 1).

### **Patients with AVWS**

AVWS-patients associated with high shear-induced VWF proteolysis (aortic stenosis, n=11; and LVAD, n=9) were selected from the WITAVI registry, a prospective registry approved by the local ethics committee, after given informed consent. In patients with LVAD, samples were collected before and three hours after initiation of LVAD support at 9000 rpm. Patients presenting AVWS due to another mechanism (MGUS-IgG, n=7) were selected. Healthy subjects were also sampled as controls (n=33).

For all the patients and healthy controls included, the phenotypic data are summarized in supplementary data (Tables 1, 2 and 3).

### **Laboratory assessment of VWF**

Samples were collected on citrate 0,129M BD Vacutainer® 5mL tubes. Poor platelet plasma was recovered after two step of centrifugation (2000g for 15 mn) and frozen at -80°C in eppendorfs. VWF antigen (VWF:Ag, Sta Liatest, Diagnostica Stago, Inc.) levels were measured by ELISA. VWF activity was assessed by a latex immunoturbidimetric assay

(Innovance® VWF Ac; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany). VWF multimeric analysis was performed as previously described <sup>[3]</sup>.

### **Determination of VWF proteolysis by ELISA**

A 96-well microplate (Immulon® 4HBX) was coated with a monoclonal antibody (mAb27642, R&D Systems, Minneapolis, MN) targeting an epitope on VWF adjacent to the cleavage site Y1605-M1606 within VWF A2 domain. Such epitope was previously reported to be cryptic on native VWF and unmasked after ADAMTS13-mediated cleavage <sup>[11]</sup>. To determine sample activity, optical density at 450 nm (OD<sub>450nm</sub>) was recorded. The calibration curve was performed using serial dilution of a partially proteolysed VWF obtained after ADAMTS13-cleavage of purified plasma-derived VWF (pdVWF) concentrate (Wilfactin®, LFB Les Ullis France) under denaturing conditions. A semi-quantitative analysis of VWF degradation was performed as control on this standard (see additional data). OD<sub>450nm</sub> obtained in samples from patients and controls were plotted against the calibration curve. VWF proteolysis rate was thus expressed as a relative percentage. The 100% of proteolysis was arbitrary set for the OD<sub>450nm</sub> obtained in patients with R1597W mutation 2A(IIA). VWF proteolysis was assessed in whole blood by our ELISA at steady-state of VWF proteolysis, in platelet lysates (unproteolyzed VWF), and in whole blood submitted to three different conditions of shear stress in a previously described LVAD model (pump's speed: 3000, 6000, 9000 rpm) <sup>[12]</sup>.

### **Statistics**

Statistical analysis was performed with Graphpad software. When appropriate, time points were compared with a Wilcoxon rank test for paired or Mann Whitney for unpaired groups. P values <0.05 were considered statistically significant.

## **Results**

### **VWF proteolysis *in-vitro***

Figure 1 shows the assessment of VWF proteolysis *in-vitro* by our ELISA. No VWF proteolysis was detected in platelet lysates. In LVAD experiments, a substantial proteolysis was observed at baseline in poor-platelet plasma. Under shear conditions, we observed a speed-related increase of VWF proteolysis in the LVAD model. Under high shear conditions (9000 rpm), VWF proteolysis was inhibited by EDTA, an unspecific inhibitor of ADAMTS13.

### **ELISA in VWD-patients**

An increased VWF proteolysis was observed in VWD-type 2A(IIA) and VWD-type 2B when compared to control, VWD-2A (IIE) and VWD-2M patients (Table 1A-B-C-D, Fig 2). This rate of proteolysis was significantly higher in 2A (IIA) patients when compared to 2B patients ( $p < 0.0001$ ). VWF proteolysis was decreased in VWD-2A (IIE) patients when compared to controls (Table 1, Fig 2). No proteolysis was detected in VWD type 3 ( $n=2$ , data not shown).

### **ELISA in AVWS-patients**

We first measured VWF-proteolysis in AVWS from different mechanisms. As expected from AVWS related to high shear cardiovascular disorders, VWF proteolysis rate was significantly increased in AS and even more in LVAD patients when compared to controls ( $p < 0,0001$ ; Table 2, Fig 3). Conversely in patients with MGUS IgG in which clearance was increased as attested by VWFpp/VWF:Ag ratio (Table 2), we found no proteolysis of VWF (Fig 3). In LVAD patients, the rate of proteolysis significantly increased as soon as 3 hours after implantation in all patients, with a parallel loss of HMW-multimers in all patients (Fig 4).

## **Discussion**

Current electrophoresis-based assays are key-players for identification of increased VWF proteolysis in VWD- and AVWS-patients. In the former indication, they are necessary to differentiate VWD subtypes 2A and 2M. This point is clinically relevant since VWD-2A patients have a more severe haemorrhagic phenotype than VWD-2M patients <sup>[13]</sup>. In the flow-chart diagnosis of VWD, our new ELISA-based assessment of VWF proteolysis could be used, after exclusion of VWD-2B and VWD-2N, to provide an easier identification of most VWD-2A(IIA) patients in whom closer follow-up and more intensive therapeutic regimens are needed <sup>[14]</sup>.

The early positive diagnosis of AVWS is also challenging most of time since electrophoresis-based assays are time-consuming and restricted to few reference centers. This drawback likely impacts the management of AVWS-patients when an urgent clinical decision is needed in case of severe bleeding complications. For gastro-intestinal bleedings occurring in LVAD setting, strategies based on the reduction of the speed of the LVAD rotor and/or the injection of VWF can be applied <sup>[9, 10]</sup>. These strategies are however at potential risk for the patients (hemodynamic instability, thrombosis) and must be considered only once the diagnosis of AVWS is confirmed. Our ELISA appears therefore as a promising alternative to current electrophoresis-based assay in this indication.

In summary, our ELISA allows a simplified diagnosis of acquired or constitutional VWF disorders associated with increased VWF proteolysis. Such assay might improve the diagnosis and management of such patients.

**Conflicts of interest:** None declared.

## References

1. Zimmerman TS, Dent JA, Ruggeri ZM, Nannini LH: **Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID, and IIE).** *J Clin Invest* 1986, **77**(3):947-951.
2. Hassenpflug WA, Budde U, Obser T et al. **Impact of mutations in the von Willebrand factor A2 domain on ADAMTS13-dependent proteolysis.** *Blood* 2006;107:2339-2345.
3. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, Six I, Fabre O, Juthier F, Bauters A, Decoene C, Goudemand J, Prat A et al: **Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis.** *N Engl J Med* 2003, **349**(4):343-349.
4. Meyer AL, Malehsa D, Bara C, Budde U, Slaughter MS, Haverich A, Strueber M: **Acquired von Willebrand syndrome in patients with an axial flow left ventricular assist device.** *Circ Heart Fail* 2010, **3**(6):675-681.
5. Tiede A, Priesack J, Werwitzke S, Bohlmann K, Oortwijn B, Lenting P, Eisert R, Ganser A, Budde U: **Diagnostic workup of patients with acquired von Willebrand syndrome: a retrospective single-centre cohort study.** *J Thromb Haemost* 2008, **6**(4):569-576.
6. Tiede A, Rand JH, Budde U, Ganser A, Federici AB: **How I treat the acquired von Willebrand syndrome.** *Blood* 2011, **117**(25):6777-6785.
7. Crow S, John R, Boyle A, Shumway S, Liao K, Colvin-Adams M, Toninato C, Missov E, Pritzker M, Martin C et al: **Gastrointestinal bleeding rates in recipients of nonpulsatile and pulsatile left ventricular assist devices.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009, **137**(1):208-215.
8. Meyer AL, Malehsa D, Budde U, Bara C, Haverich A, Strueber M: **Acquired von Willebrand syndrome in patients with a centrifugal or axial continuous flow left ventricular assist device.** *JACC Heart Fail* 2014, **2**(2):141-145.
9. Wever-Pinzon O, Selzman CH, Drakos SG, Saidi A, Stoddard GJ, Gilbert EM, Labedi M, Reid BB, Davis ES, Kfoury AG et al: **Pulsatility and the risk of nonsurgical bleeding in patients supported with the continuous-flow left ventricular assist device HeartMate II.** *Circ Heart Fail* 2013, **6**(3):517-526.
10. Fischer Q, Huisse MG, Voiriot G, Caron C, Lepage L, Dilly MP, Nataf P, Ajzenberg N, Kirsch M: **Von Willebrand factor, a versatile player in gastrointestinal bleeding in left ventricular assist device recipients?** *Transfusion* 2014.
11. Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T et al. **Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity.** *Transfusion*. 2006;**46**(8):1444-52.
12. Rauch A, Legendre P, Christophe OD, Goudemand J, van Belle E, Vincentelli A, Denis CV, Susen S, Lenting PJ: **Antibody-based prevention of von Willebrand factor degradation mediated by circulatory assist devices.** *Thromb Haemost.* 2014 Jul 17;112(5). [Epub ahead of print]
13. Castaman G, Federici AB, Tosetto A, La Marca S, Stufano F, Mannucci PM, Rodeghiero F: **Different bleeding risk in type 2A and 2M von Willebrand disease: a 2-year prospective study in 107 patients.** *J Thromb Haemost* 2012, **10**(4):632-638.
14. Federici AB, Bucciarelli P, Castaman G, Mazzucconi MG, Morfini M, Rocino A, Schiavoni M, Peyvandi F, Rodeghiero F, Mannucci PM: **The bleeding score predicts clinical outcomes and replacement therapy in adults with von Willebrand disease.** *Blood.* 2014;**123**(26):4037-44.



## Legends to Figures and Tables

### **Figure 1: ELISA assessment in a LVAD *ex-vivo* model**

Whole blood from healthy donors was perfused in the whole blood perfusion model using an Heartmate II® pump at different rotor speeds (3000, 6000 and 9000 rpm, each in triplicate). Three more runs were performed at 9000 rpm in the presence of EDTA. Sampling was performed before and after three hours after pump's start. All samples were assayed for VWF proteolysis by ELISA (A). Data (mean±SD of 3 independent experiments) are expressed as a relative percentage of VWF proteolysis. Overall time-points comparison was performed using Friedman test.  $p < 0.05$  was considered as significant.

### **Figure 2: ELISA assessment in VWD patients**

VWF proteolysis rate was assessed in VWD variants associated with increased VWF proteolysis (VWD-type 2A (IIA) (n=30), 2B (n=25), 2A (IIE) (n=20), 2M (n=14), and type 3\* (n=2). Healthy subjects were used as control (n=33). Results are expressed for each group as a relative percentage of VWF proteolysis (mean±SD). Inter-group comparisons were performed using a Mann Whitney test.  $p < 0.05$  was considered as significant.

\* data not shown (no proteolysis detected).

### **Figure 3: ELISA assessment in AVWS-patients**

VWF proteolysis rate was assessed in AS-patients (n=11), LVAD-patients (n=9) and MGUS IgG-patients (n=7). Results are expressed for each group as a relative percentage of VWF proteolysis (mean±SD). Inter-group comparisons were performed using a Mann Whitney test.  $p < 0.05$  was considered as significant.

**Figure 4: Quantitative assessment of VWF proteolysis in HeartMate-II®-LVAD-patients before and early after device implantation.**

Nine consecutive LVAD-patients were evaluated before and three hours after LVAD HeartMate-II® implantation with SDS-agarose 1.4% electrophoresis and our ELISA.

A) Representation of HMW-multimers expressed as a ratio to normal pooled plasma (NP, standard human plasma Siemens healthcare diagnostics, Marburg, Germany). (mean±SD)

B) VWF proteolysis is expressed as a relative percentage of VWF proteolysis (mean±SD).

Statistical analysis was performed using two-tailed Wilcoxon rank test.  $p < 0.05$  was considered as significant.

Figure 1

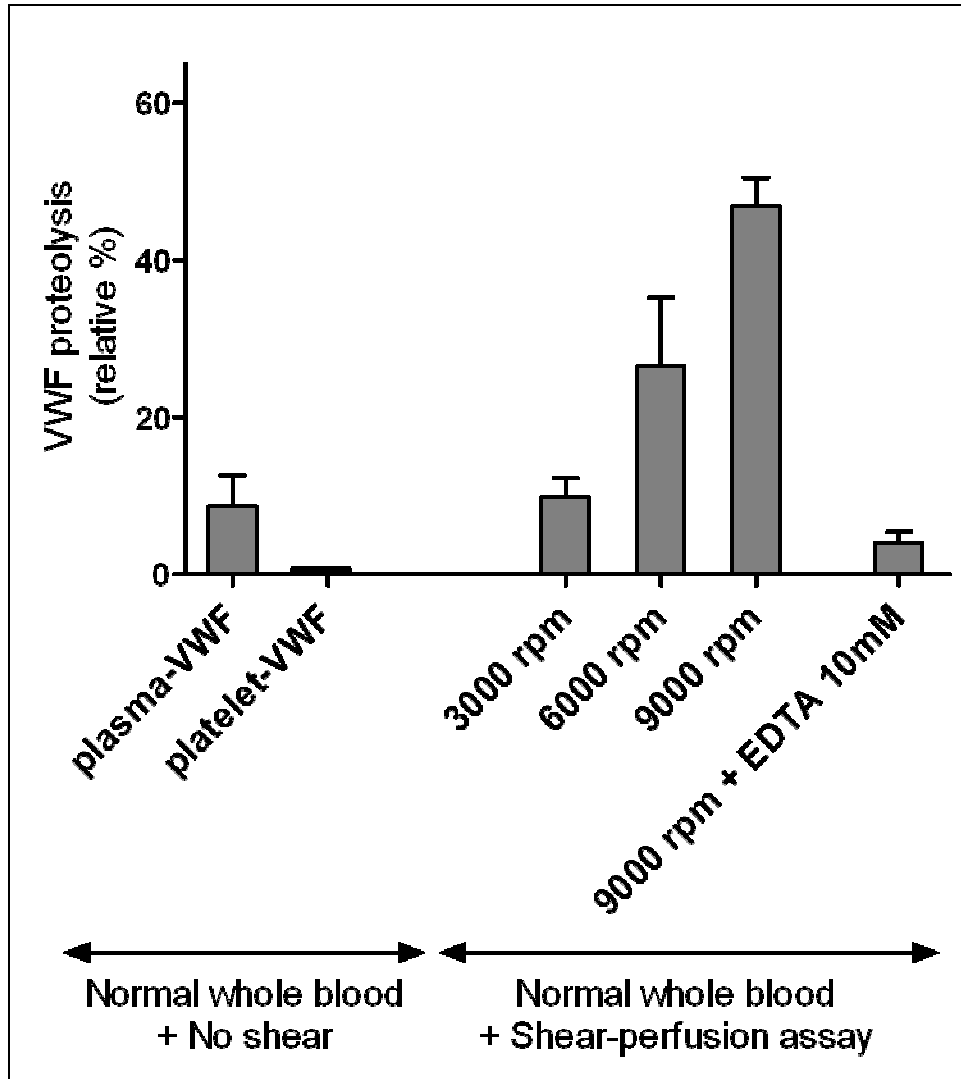


Figure 2

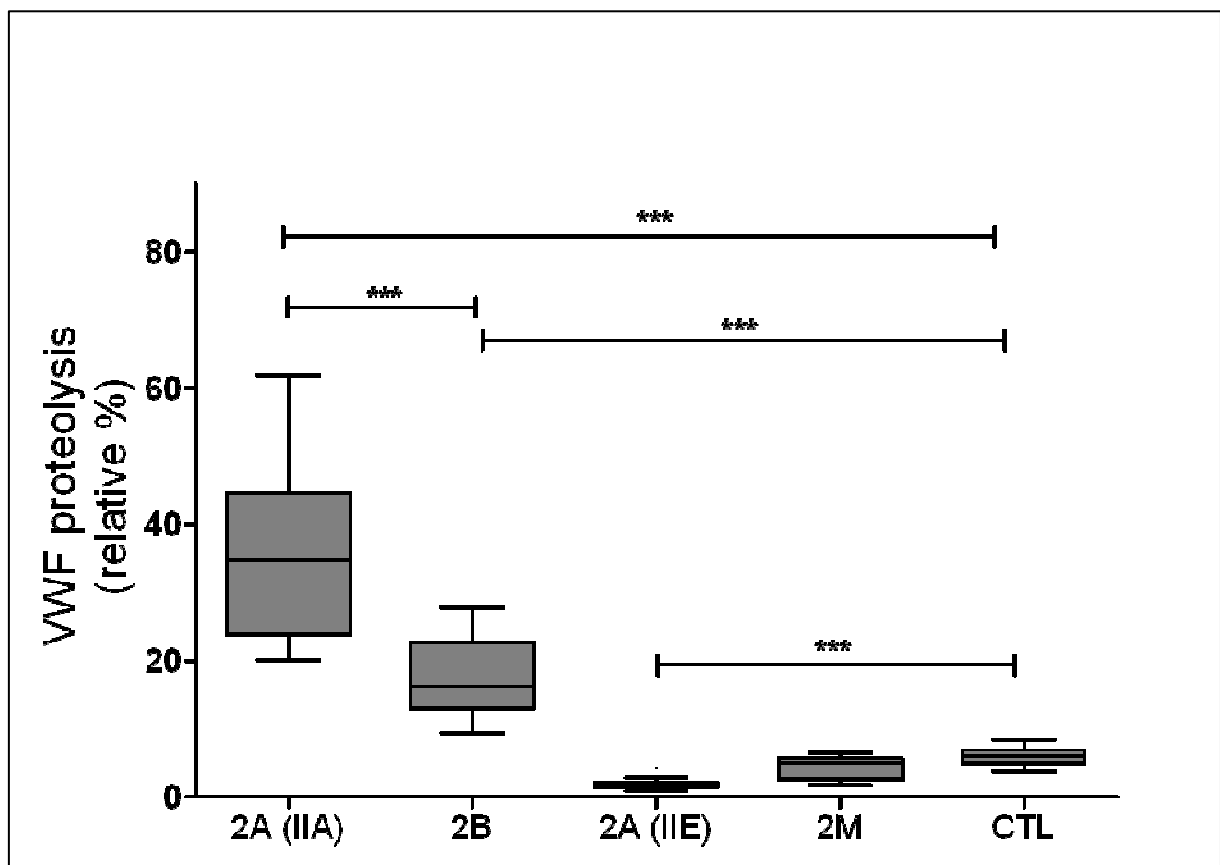


Figure 3

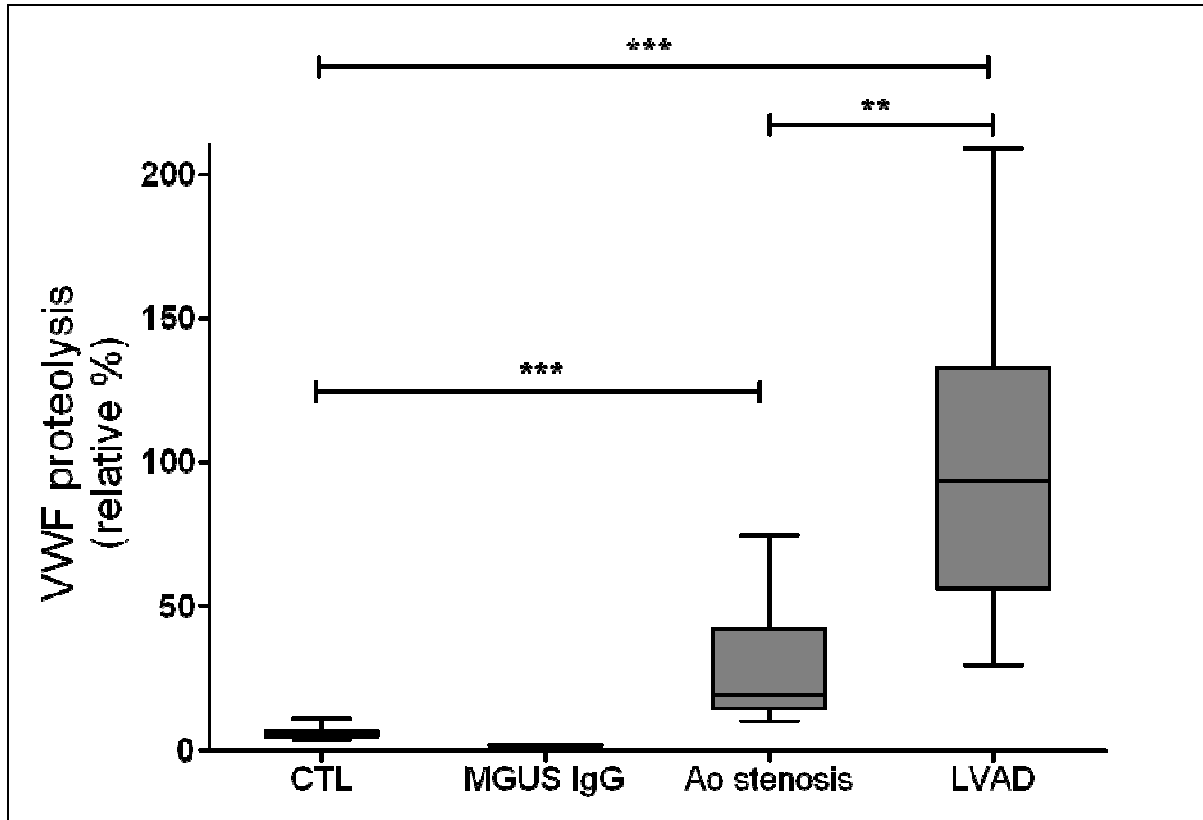
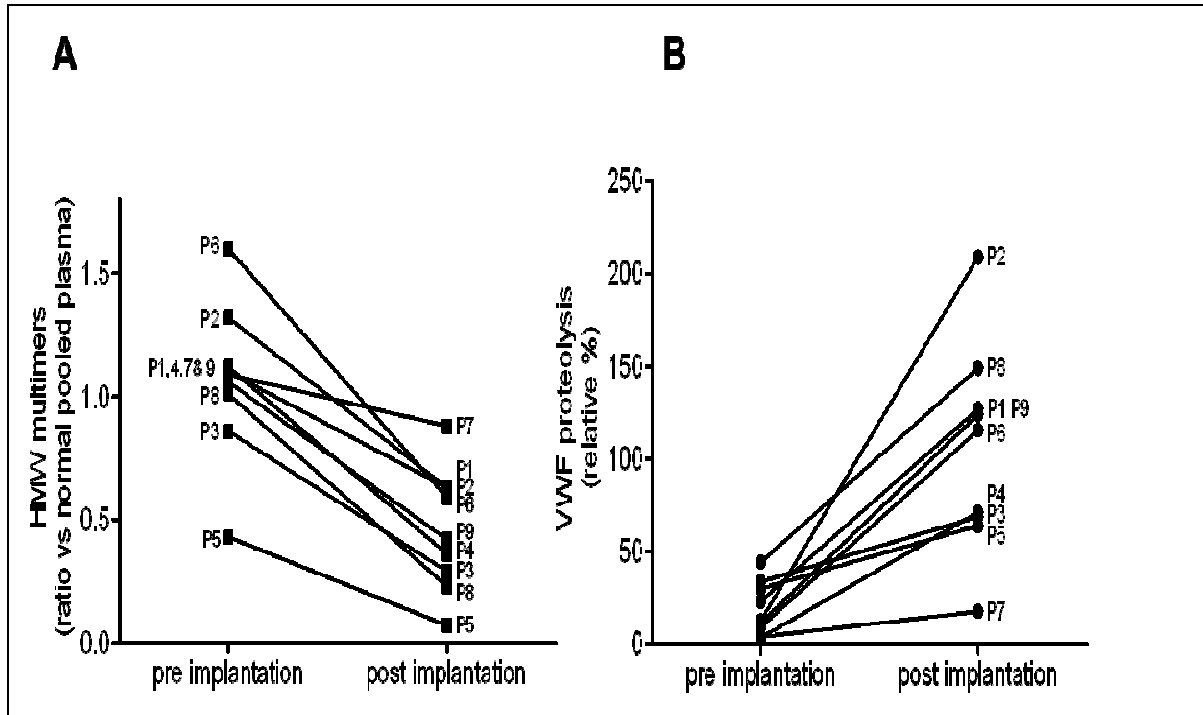


Figure 4



**Tableau 1A: phenotypic and genotypic data of VWD-2A(IIA) patients\* (Median and range)**

Mutation	Number of patients	Number of families	VWF proteolysis (relative %)	VWF:Ag (IU.dL <sup>-1</sup> )	VWF:RCo (IU.dL <sup>-1</sup> )	FVIII:C (IU.dL <sup>-1</sup> )	VWF:RCo/VWF:Ag ratio
A1500E	1	1	23.7	28	10	35	0.35
L1503P	1	1	29.4	27	10	38	0.37
G1505R	1	1	31.1	69	10	75	0.14
S1506L	4	3	22.9 (17.5-42)	16.5 (14-22)	10 (5-16)	24 (11-36)	0.61 (0.22-1.14)
F1514C	2	2	30.8 (26-35.7)	30.5 (30-31)	12 (8-16)	37 (35-39)	0.26 (0.20-0.33)
T1578N	1	1	62	49	13	39	0.27
L1580P	1	1	20	27	4	28	0.15
R1597W	10	4	30.8 (17.4-100)	36.5 (24-89)	12.5 (7-20)	48.5 (33-75)	0.3 (0.22-0.45)
G1609R	6	2	41.5 (37.7-79.3)	52.5 (46-68)	14 (11-18)	45.5 (42-62)	0.26 (0.20-0.33)
S1613P	1	1	61.4	44	10	42	0.22
I1628T	2	2	56.5 (53-60)	43 (41-45)	6.5 (5-10)	45.5 (43-48)	0.25 (0.07-0.53)
Total	30	19	34.7 (17.4-100)	40.5 (14-89)	11 (5-20)	42.5 (11-75)	0.28 (0.14-0.67)

\*HMW-multimers loss was observed in all patients

**Tableau 1B: genotypic and phenotypic data in VWD-2B patients (Median and range)**

Mutation	Number of patients	Number of families	VWF proteolysis (relative %)	VWF:Ag (IU.dL <sup>-1</sup> )	VWF:RCO (IU.dL <sup>-1</sup> )	FVIII:C (IU.dL <sup>-1</sup> )	VWF:RCO/VWF:Ag ratio
P1266L*	2	1	10.3 (10-10.6)	96.5 (95-98)	84.5 (75-94)	101 (101-101)	0.88 (0.77-0.99)
R1306Q	2	1	14.6 (12.6-16.6)	36 (24-48)	26 (21-31)	48.5 (48-49)	0.76 (0.65-0.88)
R1308C	4	2	26.3 (22.9-30)	34 (29-49)	8.5 (5-11)	35 (31-44)	0.21 (0.16-0.30)
V1316M	1	1	29.2	48	24	55	0.5
P1333L	1	1	16.3	27	14	56	0.5
R1341Q	13	5	15.4 (8.6-25.9)	43 (27-89)	25 (10-45)	42.5 (20-105)	0.51 (0.27-1.16)
A1461V	2	1	12.3 (8.5-16.2)	82.5 (80-85)	48.5 (14-83)	69.5 (52-87)	0.74 (0.5-0.98)
Total	25	12	16.2 (8.5-30)	38 (24-98)	21 (5-94)	46 (20-105)	0.5 (0.16-1.16)

\*No loss of HMW-multimers



**Tableau 1C: phenotypic and genotypic data in VWD-2A(IIIE) patients (Median and range)**

Mutation	Number of patients	Number of families	VWF proteolysis (relative %)	VWF:Ag (IU.dL <sup>-1</sup> )	VWF:RCo (IU.dL <sup>-1</sup> )	FVIII:C (IU.dL <sup>-1</sup> )	VWF:RCo/VWF:Ag ratio
C1130F	3	2	1.6 (1.4-2.8)	20 (16-42)	14 (8-22)	30 (16-71)	0.52 (0.38-0.87)
C1130W	1	1	1.7	37	17	49	0.46
C1130Y	3	1	1.4 (1-1.8)	12 (11-17)	10 (10-10)	17 (11-22)	0.83 (0.59-0.90)
Y1146C	5	4	2.9 (1.6-4.3)	17 (10-28)	11 (10-28)	22 (18-43)	0.80 (0.65-1)
C1173F	2	1	1.7 (0.8-2.3)	26.5 (21-32)	19.5 (12-27)	39 (34-44)	0.70 (0.57-0.84)
C1196R	6	1	1.7 (0.8-2.3)	23.5 (16-38)	20 (10-28)	54 (26-89)	0.77 (0.63-0.91)
Total	20	10	1.7 (0.8-4.3)	20 (10-42)	14 (8-28)	32 (11-89)	0.73 (0.38-1)

**Tableau 1D: phenotypic and genotypic data of VWD-2M patients (Median and range)**

Mutation	Number of patients	Number of families	VWF proteolysis (relative %)	VWF:Ag (IU.dL <sup>-1</sup> )	VWF:RCo (IU.dL <sup>-1</sup> )	FVIII:C (IU.dL <sup>-1</sup> )	VWF:RCo/VWF:Ag ratio
Q1402P	2	1	5.5 (5.4-5.6)	43.5 (42-45)	14 (10-18)	36 (31-41)	0.32 (0.24-0.4)
N1421I	1	1	5.6	22	6	30	0.27
L1696R	5	2	5.3 (2.4-6.8)	17 (13-23)	12 (10-15)	40 (34-46)	0.75 (0.61-0.79)
Y1735D	6	1	2.7 (1.6-6.1)	22 (12-29)	21 (5-24)	40 (23-53)	0.85 (0.42-1.22)
Total	14	5	4.8 (1.6-6.8)	22 (12-45)	14 (5-24)	39 (23-53)	0.73 (0.24-1.22)

**Tableau 2: phenotypic data of AVWS-patients (Median and range)**

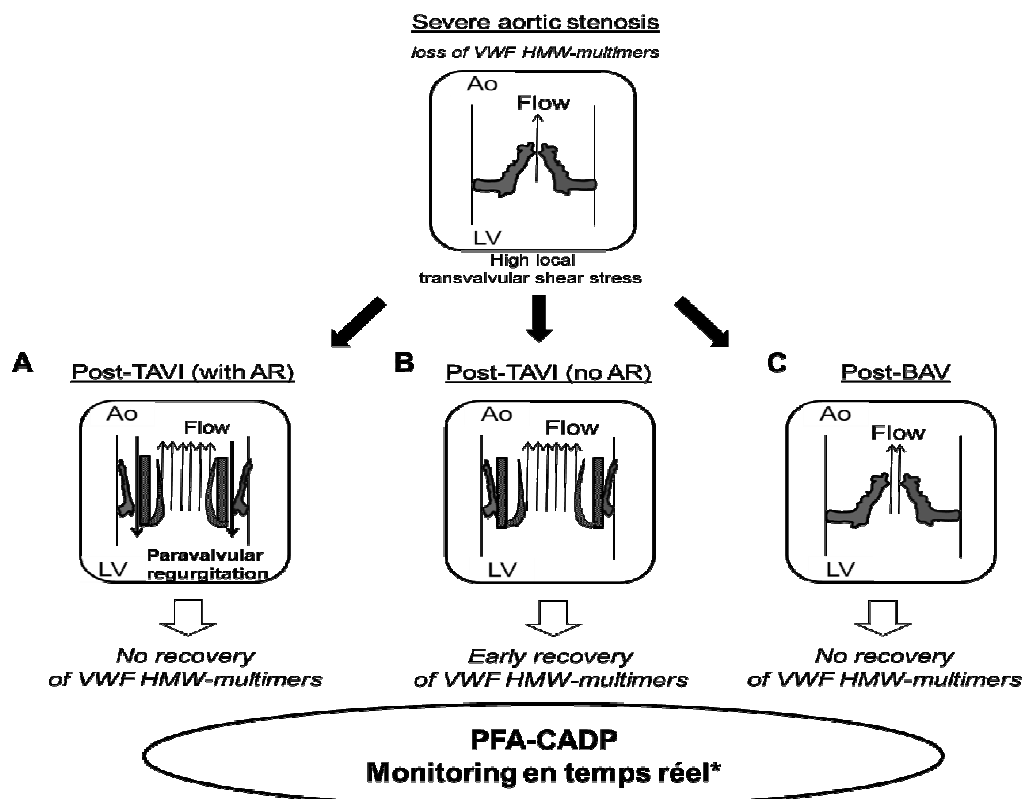
	Number of patients	VWF proteolysis (relative %)	VWF:Ag* (IU.dL <sup>-1</sup> )	VWF:CB* (IU.dL <sup>-1</sup> )	FVIII:C* (IU.dL <sup>-1</sup> )	VWF:CB/VWF: Ag ratio	VWF:pp/VWF: Ag ratio
LVAD	9	93 (29-209)	270 (128-500)	203 (129-464)	nd	0.88 (0.55-1.14)	1.8 (1.6-3.5)
Aortic stenosis	11	19 (10-74)	147 (67-432)	97 (60-311)	nd	0.66 (0.58-0.89)	nd
MGUS IgG	7	Not detected	12 (4-25)	10 (4-16)	28 (4-33)	nc	10.9 (6-33)

## **DISCUSSION GENERALE**

Dans la première partie de cette thèse, nous avons étudié les cinétiques d'apparition et de réversion du déficit en VWF-HPM en réponse à des variations aiguës d'anomalies de flux dans deux cardiopathies à forces de cisaillement élevées: le Rao et l'ACM-FC. Nous avons effectué cette étude dans un modèle d'ACM-FC *ex-vivo* et dans trois conditions distinctes *in-vivo*: un modèle lapin de sténose de l'aorte ascendante, chez des patients en insuffisance cardiaque terminale bénéficiant de l'implantation d'une assistance ventriculaire gauche et chez des patients porteurs d'un Rao sévère bénéficiant d'une valvuloplastie aortique ou de l'implantation d'une bio-prothèse Edwards XT® par voie trans-cathéter. Ce travail démontre l'existence de variations extrêmement dynamiques du profil multimérique du VWF et du PFA-CADP en réponse aux soudaines modifications de l'intensité des forces de cisaillement dans les conditions étudiées. De façon notable, la correction incomplète du Rao par valvuloplastie s'accompagne d'une récupération incomplète des VWF-HPM alors que le déploiement d'une bio-prothèse au niveau de l'anneau aortique permet une correction rapide et totale du déficit en VWF-HPM. Le PFA-CADP suit une cinétique similaire aux VWF-HPM dans les groupes valvuloplastie et TAVI permettant ainsi un monitoring en temps réel du degré de correction du Rao. Cette étude désigne le VWF comme un bio-marqueur d'anomalie de flux potentiellement utile pour l'évaluation des procédures de traitement du Rao par voie trans-cathéter.

Notre étude met en évidence une grande hétérogénéité dans la mesure des VWF-HPM et du PFA-CADP dans les deux groupes TAVI et BAV. Une grande dispersion des résultats est également observée dans le modèle animal lapin. Différents facteurs anatomiques sont susceptibles de contribuer à cette variabilité. Chez le lapin, bien que nous ayons standardisé la procédure de banding aortique, nous ne pouvons exclure un degré de sténose aortique et donc de forces de cisaillements, variable d'un animal à l'autre. Chez l'homme, plusieurs facteurs

anatomiques sont susceptibles de contribuer à la variabilité interindividuelle des mesures de VWF-HPM et PFA-CADP. Cette variabilité était attendue dans le groupe BAV en lien avec le caractère partiel et aléatoire de la correction du Rao avec cette procédure. A diamètre de ballonnet égal, la correction du Rao suite au geste de dilatation est en effet réputée très variable d'un patient à l'autre. Concernant les patients TAVI, deux facteurs anatomiques pourraient contribuer à la persistance de forces de cisaillement anormalement élevées : la présence d'une régurgitation para-prothétique (**Figure 16**) ou l'existence d'un mismatch entre l'anneau aortique et la bio-prothèse <sup>[138]</sup>.



**Figure 16 : Persistance d'un déficit en VWF-HPM post-TAVI : hypothèse de la régurgitation para-valvulaire.** Une régurgitation para-valvulaire complique environ 20% des implantations TAVI. En TAVI, la persistance de forces de cisaillement anormalement élevées secondaire à cette fuite para-valvulaire pourrait se traduire par une récupération partielle des VWF-HPM et du PFA-CADP (A) alors qu'en l'absence de fuite ces deux paramètres se corrigeraient rapidement (B) En BAV, la correction partielle du Rao ne permet pas la disparition des anomalies de forces de cisaillement ce qui se traduirait par la persistance d'un déficit en VWF-HPM et d'un PFA-CADP allongé.

Ce travail n'avait pas pour objectif de déterminer les mécanismes sous-jacents aux variations rapides du profil multimérique du VWF observées dans le Rao et l'ACM-FC. Bien qu'elle puisse se révéler informative à cet égard, l'étude du profil multimérique du VWF ne permet pas toujours de déterminer avec certitude le ou les mécanismes causals sous-jacents. Le caractère dynamique de la perte des VWF-HPM à l'induction du Rao chez le lapin et de l'ACM-FC chez l'homme semble compatible avec une protéolyse par l'ADAMTS13 mais nos données ne permettent pas d'exclure l'implication d'autres mécanismes. Un rôle causal de l'ADAMTS13 semble néanmoins probable. Nous avons en effet vu dans la première partie de la thèse que la dégradation du VWF dans le modèle HeartMate-II® *ex-vivo* est inhibée en présence d'un inhibiteur non-spécifique de l'ADAMTS13, l'EDTA, ou d'un anticorps ciblant le domaine D4 du VWF. Le domaine D4 du VWF contient un exosite critique pour l'interaction initiale entre VWF et ADAMTS13 en conditions de flux <sup>[61]</sup>. Si nous avons confirmé en milieu purifié que cet anticorps inhibe partiellement la dégradation du VWF par l'ADAMTS13 en présence de forces de cisaillement élevées, son mécanisme d'inhibition n'a pas été caractérisé. Le VWF plasmatique est un véritable bus moléculaire avec pas moins de 24 ligands identifiés à ce jour <sup>[139]</sup>. L'intervention d'une autre protéase se liant au VWF à proximité du domaine D4 ne peut donc être formellement exclue.

L'induction d'une ACM-FC par HeartMate-II® induit une perte moins rapide des VWF-HPM *in-vivo* comparé à ce qui est observé dans le modèle *ex-vivo*. Ceci témoigne de l'intense activation endothéliale engendrée par la mise en route de l'ACM-FC *in-vivo*, indépendamment de la CEC. L'augmentation du VWFpp cinq minutes après l'initiation de l'ACM-FC témoigne d'une libération immédiate et importante de VWF par les corps de Weibel-Palade, probablement sous l'influence de la soudaine augmentation de débit cardiaque. Par ailleurs, la fréquence de recirculation plus élevée de la totalité de la masse

sanguine au travers de la pompe d'ACM-FC dans le modèle *ex-vivo* peut également contribuer à une dégradation plus intense des VWF-HPM.

Une activation endothéliale systémique et la normalisation des forces de cisaillement au travers de la valve aortique sont susceptibles de rendre compte de la rapide restauration des VWF-HPM observée après traitement du Rao *in-vivo*. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées concernant l'association observée entre la correction du Rao et la libération de VWF par l'endothélium activé. Une activation endothéliale secondaire à la procédure de cathétérisme est possible mais l'absence de correction du profil multimérique du VWF dans le groupe contrôle valvuloplastie suggère un autre mécanisme. Une restauration immédiate de la pulsatilité artérielle secondaire à la correction du Rao est une hypothèse alternative séduisante <sup>[140]</sup> mais qui reste spéculative en l'absence d'études spécifiques. La pulsatilité artérielle cependant semble avoir un impact sur le métabolisme du VWF. En effet, l'importance de la libération endothéliale de VWF à partir des corps de Weibel-Palade varie en fonction des conditions de flux *in-vitro* <sup>[20]</sup>. Par ailleurs, les pompes d'ACM pulsatiles semblent ne pas induire une protéolyse excessive du VWF alors que celle-ci est systématique sous ACM-FC <sup>[121]</sup>. De façon notable, sous ACM-FC, la restauration d'une pulsatilité artérielle résiduelle diminue l'intensité du syndrome hémorragique <sup>[141]</sup>. L'influence de la nature pulsatile ou non d'une pompe d'ACM-FC sur la sécrétion endothéliale de VWF est inconnue.

L'idée de disposer d'un test au lit du malade permettant l'évaluation immédiate du profil multimérique du VWF ou de la fonction plaquettaire chez les patients BAV et TAVI peut paraître spéculative. Nous émettons cependant l'hypothèse qu'un tel test « bedside » serait d'un intérêt clinique capital pour l'évaluation en salle de cathétérisme de la qualité de l'implantation d'une bio-prothèse aortique par voie percutanée (procédure TAVI). Dans notre étude, le rationnel de l'inclusion de patients BAV s'est effectuée dans l'optique de disposer



d'un groupe contrôle « correction partielle du Rao » par rapport au groupe TAVI « correction totale du Rao » et non de proposer un monitoring biologique de cette procédure. Une lésion irréversible de l'anneau aortique secondaire à une dilatation trop agressive constitue la principale complication des valvuloplasties, qui ne paraissent pas ainsi une indication évidente pour un monitoring par le VWF-HPM ou le PFA-CADP.

Au total, les données de cette étude sont prometteuses mais nécessitent d'être confirmées sur un plus grand effectif. La cohorte prospective WITAVI (Willebrand TAVI) aura pour objectifs de confirmer l'intérêt de cette évaluation cinétique péri-procédurale du VWF et/ou du PFA-CADP et d'étudier leur corrélation à des facteurs anatomiques per- ou post-procéduraux ainsi qu'au pronostic. Sur un plan méthodologique, l'évaluation quantitative des VWF-HPM nécessite le recours à une électrophorèse sur gel d'agarose. La complexité technique et le caractère chronophage de cette électrophorèse restreignent sa réalisation à de rares laboratoires et ne permettent qu'une évaluation rétrospective de ce paramètre. Le PFA est un test diagnostique rapide qui a une bonne valeur prédictive négative pour la VWD acquise ou constitutionnelle à l'exception de la VWD de type 2N. En présence d'une anémie ou d'une thrombopénie, ce test est cependant ininterprétable ce qui constitue une limite non négligeable chez des sujets âgés où l'anémie a une prévalence élevée. Ces deux limites illustrent la nécessité d'un test alternatif pour le monitoring biologique des patients TAVI.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous démontrons le potentiel d'une thérapie ciblée à base d'anticorps monoclonal pour la prévention de la dégradation du VWF sous ACM-FC. Cette approche est basée sur une inhibition partielle de l'interaction VWF-ADAMTS13 via un anticorps monoclonal dirigé contre la partie distale domaine D4 du VWF. Cette approche semble associée à un risque faible de PTT pharmaco-induit car elle préserve un niveau résiduel de protéolyse du VWF.

Si la validité de cette approche se confirmait, le service médical rendu serait important au vu de l'impasse thérapeutique représentée par les hémorragies digestives survenant sous ACM-FC. Le caractère succinct des recommandations de l'ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation) concernant la prise en charge des hémorragies digestives sous ACM-FC illustrent bien cette problématique. Une endoscopie digestive à la recherche d'angiodysplasies accessibles à une électrocoagulation et un arrêt des traitements anti-agrégants et anticoagulants sont ainsi préconisés systématiquement <sup>[132]</sup>. Le traitement endoscopique des angiodysplasies digestives est cependant régulièrement mis en échec en raison du caractère multifocal et récidivant de ces lésions ou de leur inaccessibilité au niveau de l'intestin grêle <sup>[89]</sup>. Par ailleurs, l'arrêt des traitements anticoagulants et antiagrégants recommandé en phase aigüe pourrait majorer le risque d'événements thrombotiques ultérieurs <sup>[142]</sup>. Certains centres ont reporté une efficacité de l'octréotide, un analogue de la somatostatine, ou de la thalidomide pour le traitement des hémorragies digestives sous ACM-FC <sup>[143, 144]</sup>. Cependant, en l'absence d'études cliniques spécifiques, ces résultats doivent être interprétés avec prudence. Ces deux molécules anti-angiogéniques sont parfois utilisées en gastro-entérologie en cas d'hémorragies digestives récurrentes sur angiodysplasies rebelles à une prise en charge endoscopique <sup>[145, 146]</sup>. Dans cette indication, une méta-analyse met en

évidence une balance bénéfico-risque et un niveau de preuve plus favorable à l'octréotide qu'à la thalidomide <sup>[89]</sup>.

La perte des VWF-HPM semble nécessaire mais non suffisante pour la survenue d'hémorragies digestives sur angiodysplasies. Ceci suggère l'existence de mécanismes additionnels dans l'apparition des angiodysplasies en lien ou non avec le déficit en VWF-HPM. Nous avons vu que certains auteurs proposent l'hypothèse d'une dysrégulation du processus angiogénique qui serait secondaire au déficit en VWF <sup>[47, 147]</sup>. En effet, le VWF semble jouer un rôle important dans la régulation négative du processus angiogénique. Les VWF-HPM pourraient être particulièrement importants dans cette régulation même si cela reste à démontrer. Sur le plan physiopathologique, ces données expérimentales suggèrent ainsi l'éventuel intérêt d'un traitement à visée anti-angiogénique dans les formes acquises ou constitutionnelles de VWD compliquées d'hémorragies digestives sur angiodysplasies. Cette hypothèse demeure cependant spéculative en l'absence d'essais cliniques spécifiques. D'autres facteurs, indépendamment du VWF pourraient également contribuer à l'apparition de lésions angiodysplasiques sous ACM-FC : un faible niveau de pulsatilité artérielle résiduelle, l'ischémie mésentérique ou le degré d'anticoagulation <sup>[120, 141]</sup>. Depuis 2010, certains experts américains préconisent ainsi un niveau inférieur d'anticoagulation par anti-vitamines K pour tout patient sous HeartMate-II®, avec une INR cible entre 1.5 et 2.5 <sup>[116]</sup> versus INR cible entre 2 et 3 dans les essais cliniques princeps <sup>[110, 111]</sup>. Si cette stratégie a permis une réduction significative de l'incidence des hémorragies digestives sous HeartMate-II®, une augmentation significative des thromboses de pompe a été reportée chez les patients implantés aux USA après mars 2011 <sup>[148]</sup>.

Notre modèle HeartMate-II® *ex-vivo* supporte l'hypothèse d'un rôle majeur de l'ADAMTS13 dans la dégradation du VWF observée sous ACM-FC. La perte des VWF-HPM et la présence

de fragments de dégradation ne sont pas spécifiques de l'ADAMTS13 car d'autres protéases peuvent cliver le VWF, notamment certaines protéases leucocytaires <sup>[149-151]</sup> et la plasmine <sup>[152]</sup>. La taille des fragments de clivage identifiés par immuno-précipitation suggère un clivage intervenant au sein du domaine A2, ce qui semble exclure un rôle de la plasmine. La persistance d'une dégradation importante du VWF sur plasma pauvre en plaquettes dans le modèle HeartMate-II® *ex-vivo* et son inhibition par un anticorps bloquant l'interaction VWF-ADAMTS13 vont à l'encontre d'un rôle des protéases leucocytaires. La dégradation du VWF apparaît cependant bien de nature protéolytique. L'inhibition quasi-totale de cette dégradation et une perte similaire des VWF-HPM après perfusion de plasma pauvre en plaquettes vont à l'encontre d'une dégradation du VWF d'origine mécanique et suggèrent l'intervention d'une protéase plasmatique. L'activité catalytique de cette protéase semble régulée par l'intensité des forces de cisaillement car la perte des VWF-HPM et l'apparition des bandes satellites, visibles sur le profil multimérique, sont dépendantes de la vitesse de la pompe rotative dans le modèle HeartMate-II® *ex-vivo*. Pour autant, ce travail n'apporte pas la preuve formelle du rôle causal de l'ADAMTS13. Celle-ci nécessiterait de tester un anticorps anti-ADAMTS13 ciblant le domaine métalloprotéase dans notre modèle <sup>[153]</sup>.

La principale limite de ce travail réside tout d'abord dans l'absence de modèle animal permettant de tester la validité de notre approche *in-vivo*. Cette étape serait cependant essentielle pour confirmer l'efficacité de notre approche dans la prévention du saignement et sa sécurité sur le plan thrombotique. Une évaluation de l'Ac508 dans les modèles d'assistance actuels est en effet impossible car l'évaluation préclinique de ces dispositifs repose actuellement sur des animaux disposant d'une grande capacité volémique, comme le porc, le veau ou le bœuf <sup>[131, 154]</sup>. L'utilisation *in-vivo* d'anticorps monoclonaux murins à des fins diagnostiques ou thérapeutiques chez d'autres animaux que la souris ou chez l'homme est

limitée par leur forte immunogénicité induisant la synthèse d'anticorps anti-souris neutralisants. Le développement d'anticorps monoclonaux à visée thérapeutique a connu un formidable essor ces dernières années avec actuellement environ une vingtaine d'anticorps monoclonaux commercialisés. Le développement d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain a cependant un coût très élevé avec un risque d'échec important. Une alternative intéressante et plus abordable économiquement est la production de fragments d'anticorps recombinants de type nanobodies via la technique du « phage display ». Ces anticorps de lama ont en effet comme avantages une faible immunogénicité et un coût de production réduit <sup>[155, 156]</sup>.

Ce dernier point est d'autant plus important que le marché de l'ACM-FC est très concurrentiel. Deux nouvelles approches, au stade d'essai clinique, ont pour ambition de limiter les comorbidités hémorragiques et thrombotiques observées avec les actuelles assistances circulatoires mécaniques. La première approche consiste à développer des nouveaux dispositifs d'ACM-FC plus rhéocompatibles, qui induiraient moins d'hémolyse et/ou de protéolyse du VWF. La deuxième approche consiste à développer un cœur artificiel pulsatile hémocompatible qui permettrait de s'affranchir du traitement anticoagulant <sup>[157]</sup>. Une troisième alternative serait l'administration de concentrés de VWF en prophylaxie primaire, notamment dans les trois mois suivants l'implantation où l'incidence des complications hémorragiques est la plus élevée. L'administration exogène de VWF (VWF-HPM notamment) est susceptible de restaurer une adhésion et une agrégation plaquettaire normale et/ou d'avoir un effet anti-angiogénique <sup>[158]</sup>. Cette approche n'est cependant pas dénuée de risque thrombotique au vu des comorbidités cardio-vasculaires des patients sous ACM-FC et du risque thrombotique en lien avec une administration trop intensive de concentrés de VWF. Aussi, seule l'utilisation d'un concentré de VWF pauvre en FVIII paraît envisageable dans

cette indication <sup>[159]</sup>. Un Projet Hospitalier de Recherche Clinique a été déposé par notre équipe en vue d'une prophylaxie des hémorragies sous ACM-FC, par concentrés de Willebrand Wilfactin®, limitée aux trois premiers mois post-opératoires. Cette étude devrait permettre d'évaluer l'efficacité et éventuellement le mode d'action de l'administration de VWF-HPM par voie exogène.

Ce travail de thèse illustre enfin la nécessité d'une évaluation préclinique plus approfondie des dispositifs d'ACM sur le plan hémostatique. Au-delà du degré variable d'hémolyse globulaire ou de protéolyse du VWF induits par les dispositifs d'ACM, il serait ainsi intéressant d'analyser plus exhaustivement leur impact sur l'endothélium, les plaquettes ou les leucocytes. L'activation endothéliale et/ou plaquettaire est en effet susceptible d'induire la génération de microparticules pro-thrombotiques. Les NETs constituent également un autre mécanisme susceptible de contribuer au risque thrombotique sous ACM mais ce point n'a pas encore fait l'objet d'étude spécifique. Cette étape est cruciale pour s'assurer de la sécurité d'emploi de ces dispositifs et/ou identifier de nouvelles cibles accessibles à une thérapie plus ciblée sur le plan anti-thrombotique.

Dans la troisième partie de cette thèse, nous mettons en évidence l'intérêt d'une approche ELISA pour la prise en charge des formes constitutionnelles ou acquises de VWD associées à un excès de protéolyse du VWF.

Cette quantification de la protéolyse du VWF par une méthode ELISA serait susceptible de permettre un typage plus rapide de la VWD constitutionnelle. Dans cette indication, notre ELISA pourrait représenter une alternative avantageuse à l'électrophorèse, qui tient actuellement une place centrale dans la stratégie de typage, après exclusion des variants 2B et 2N de VWD. Notre test permet en effet une distinction rapide des sous-types 2A et 2M de VWD constitutionnelle. Une identification rapide du sous-type 2A est justifiée cliniquement car ce variant justifie un suivi médical plus régulier et un traitement substitutif plus intensif en raison d'un phénotypique hémorragique plus sévère, avec notamment une prévalence élevée d'hémorragies digestives <sup>[90]</sup>.

Cette approche ELISA pourrait également permettre un diagnostic précoce des VWD acquises associées à une protéolyse excessive du VWF. Ceci n'est pas réalisable avec les techniques électrophorétiques actuelles, ce qui impacte négativement la prise en charge de ces patients en cas de manifestations hémorragiques sévères. La prochaine étape consistera à étudier si l'intensité de la protéolyse du VWF mesurée en ELISA est corrélée à l'intensité du phénotype hémorragique.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



Ce travail de thèse avait comme objet d'étude le syndrome de Willebrand acquis secondaire aux cardiopathies à forces de cisaillement élevées.

Il a permis d'en préciser la physiopathologie en mettant en évidence le caractère extrêmement dynamique de l'induction et de la réversion des anomalies de multimérisation du VWF *in-vivo* en fonction des variations soudaines de flux sanguin. Le monitoring de la cinétique de réversion du syndrome de Willebrand acquis lors de la prise en charge du rétrécissement aortique par cardiologie interventionnelle souligne le caractère discriminant de l'évaluation péri-procédurale des multimères de haut poids moléculaire (VWF-HPM) ou du PFA-CADP pour déterminer la qualité de l'implantation valvulaire post-procédurale. La cohorte prospective WITAVI aura pour objectifs de déterminer l'intérêt pronostique de cette évaluation cinétique péri-procédurale du VWF et sa corrélation à des facteurs anatomiques per- ou post-procédurales.

Ce travail s'est également centré sur le syndrome de Willebrand acquis observé sous assistance circulatoire mécanique à flux continu. Nous avons fait la preuve d'un concept de thérapie ciblée préventive du syndrome de Willebrand acquis reposant sur un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine D4 du VWF. La prochaine étape sera le criblage d'une librairie de nanobodies anti-VWF développée par l'U770, en vue de l'identification d'un nanobody anti-VWF D4 utilisable dans un modèle animal d'assistance circulatoire mécanique *in-vivo*. La détermination des mécanismes sous-jacents à la dégradation du facteur Willebrand sous assistance circulatoire mécanique fait actuellement l'objet d'un travail collaboratif. Par ailleurs, nous avons déposé un PHRC national pour évaluer l'efficacité sur la prévention des manifestations hémorragiques post-opératoires et digestives, dans les trois premiers mois suivant l'implantation d'une assistance ventriculaire gauche à flux continu, d'une prophylaxie

par concentré de facteur Willebrand pauvre en facteur VIII (Wilfactin®). Cet essai clinique permettra également d'étudier si la sévérité du syndrome hémorragique est corrélée à l'intensité de la protéolyse du VWF (mesurée par notre test ELISA) et/ou associée à des perturbations pro-angiogéniques. Enfin, nous avons comme projet de développer un modèle animal d'assistance circulatoire mécanique chez le porc en vue d'étudier le rôle de la pulsativité artérielle résiduelle sur le métabolisme du Willebrand.

## **ANNEXES**

## **Revue 1: On the versatility of von Willebrand factor**

Antoine Rauch, Nikolett Wohner, Olivier D. Christophe, Cécile V. Denis, Sophie Susen, Peter J. Lenting. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2013 Jul 10;5(1):e2013046

### **Abstract**

Von Willebrand factor (VWF) is a large multimeric protein, the function of which has been demonstrated to be pivotal to the haemostatic system. Indeed, quantitative and/or qualitative abnormalities of VWF are associated with the bleeding disorder Von Willebrand disease (VWD). Moreover, increased plasma concentrations of VWF have been linked to an increased risk for thrombotic complications. In the previous decades, many studies have contributed to our understanding of how VWF is connected to the haemostatic system, particularly with regard to structure-function relationships. Interactive sites for important ligands of VWF (such as factor VIII, collagen, glycoprotein Iba, integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and protease ADAMTS13) have been identified, and mutagenesis studies have confirmed the physiological relevance of the interactions between VWF and these ligands. However, we have also become aware that VWF has a more versatile character than previously thought, given its potential role in various non-hemostatic processes, like intimal thickening, tumor cell apoptosis and inflammatory processes. In the present review, a summary of our knowledge on VWF structure-function relationships is provided in the context of the "classical" haemostatic task of VWF and in perspective of pathological processes beyond haemostasis.

## Introduction

Von Willebrand factor (VWF) is a protein that has historically been known for its role in the haemostatic process. However, many hurdles had to be taken between the initial description in 1926 of the bleeding tendency that is now known as Von Willebrand disease (VWD)<sup>1</sup> and the identification of the protein that is associated with this disorder. Indeed, it took 30 years after the seminal paper by Erik von Willebrand, before it was reported that the bleeding episodes in von Willebrand disease could be corrected upon the infusion of a plasma factor<sup>2</sup>. The search for the identity of this plasma component was far from simple, as it was complicated by the multimeric nature of VWF and the notion that VWF circulates in complex with coagulation factor VIII (FVIII), the protein that is associated with hemophilia A. The technical difficulties that needed to be addressed have nicely been put in context in several personal anecdotes on the events that led to the discovery in the early 1970s that VWF and FVIII are separate proteins and that VWF is a multimeric protein<sup>3-5</sup>. The identification of VWF as a plasma component that is associated with VWD provided the basis for numerous additional studies. For starters, the purified protein was used to determine its sequence, which in turn was needed to clone the gene encoding VWF<sup>6-10</sup>. This breakthrough stimulated the rapid expansion of our knowledge on the epidemiology, genetics and molecular basis of VWD<sup>11,12</sup>. With the help of recent multicenter studies in Europe, Canada and the USA, our insight into the complex genetic background of VWD has been dramatically improved, a necessary step to further refine clinical and laboratory diagnosis of the disease<sup>13,14</sup>. Clinical studies further taught us that the critical role of VWF in haemostasis is not only obvious from the bleeding tendency that is associated with its functional deficiency, but also in view of its relationship with thrombotic disorders. Increased levels of VWF have been shown to be predictive for atherothrombotic complications<sup>15-22</sup>. In line with VWF being a risk factor for

atherothrombotic complication, a recent study reported a reduced prevalence of arterial thrombosis in patients with VWD<sup>23</sup>. Importantly, the role of VWF in the development of thrombotic complications is not limited to myocardial infarctions, but also include stroke and venous thrombosis<sup>24-28</sup>. Of note, the contribution of VWF to venous thrombosis may be both direct as part of a complex with neutrophil extracellular traps (NETs)<sup>29</sup>, and indirect via FVIII (which is an independent risk factor for venous thrombosis), given the role of VWF being a determinant of FVIII plasma levels<sup>30,31</sup>.

Fundamental studies on the structure-function relationships of VWF provided insight into how this multimeric protein supports the different aspects of the haemostatic process. Importantly, from these studies it also became clear that VWF has a more versatile character than previously thought, given its potential role in various non-hemostatic processes, like cell proliferation and tumor cell apoptosis<sup>32</sup>. In the present review, an overview of our current knowledge of VWF structure and function will be provided. Subsequently, we will describe the contribution of VWF to (patho)-physiological processes beyond haemostasis. Finally, we will discuss how shear stress and modulation of multimer size regulate classical and novel functions of VWF.

## **Structure of VWF**

The biosynthesis of VWF has been described extensively in several excellent reviews (see for example Wagner<sup>33</sup> and Sadler<sup>34,35</sup>). Its synthesis is limited to endothelial cells and megakaryocytes<sup>36,37</sup>, where it is produced as a single chain pre-pro-protein. It consists of a 22-amino acid signal peptide, a 741-amino acid propeptide and a mature subunit of 2050 amino acids (Figure 1)<sup>33-35</sup>. Initial analysis of the VWF primary structure revealed that the molecular

architecture of the pro-protein distinguishes a discrete domain structure, arranged as D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK, with the propeptide comprising the D1-D2 domains, and the mature subunits the remaining domains<sup>33-35,38</sup>. More recently, the domain structure of VWF has been re-evaluated using structural information of other proteins with homologous domains in combination with electron microscopy techniques<sup>39-41</sup>. This exercise revealed a number of interesting insights. First, it allowed a more detailed assignment of disulfide bonds between cysteines throughout the molecule<sup>41</sup>. Second, it appeared that the D-domains have a more complex structure than initially thought. In fact, D-domains consist of 4 independent structures: a von Willebrand domain, a Cysteine-8 structure, a trypsin-inhibitor-like (TIL)-fold and an E module (Figure 1)<sup>41</sup>. Third, the region aminoterminal to the D4 domain (i.e. the B1-B2-B3-C1-C2 domains) was recognized to consist of 6 consecutive C-domains instead, with the Arg-Gly-Asp (RGD)-integrin recognition sequence being located in the C4 domain (Figure 1)<sup>41</sup>. These new insights in VWF structure will help us to better understand the cross-talk between domains in the functions of VWF.

A most intriguing aspect of VWF biology concerns the multimeric structure of the protein. The mature VWF protein exists as a heterologous series of covalently-linked mature subunits ranging from dimers (molecular weight 0.5 millionDa) to large polymers consisting of over 40 subunits (molecular weight >20 millionDa)<sup>33-35</sup>. As will be discussed later in this review, the multimer structure is important for a subset of VWF functions, and regulation of multimer size and quaternary structure is an important tool to modulate these functions.

## **The classical functions of VWF: FVIII binding**

The intricate linkage between VWF and FVIII is perhaps best illustrated by the nomenclature that was previously used to distinguish between the coagulation- and platelet-related activities of the complex: FVIII coagulant activity (FVIII:C), FVIII related antigen (FVIII:RAg) and FVIII ristocetin cofactor activity (FVIII:RCF)<sup>42</sup>. In fact, some still use the term FVIII:RAg instead of VWF to describe staining of endothelial cells in the immunohistochemical analysis of healthy and pathological tissues (see e.g. Bauer et al.<sup>43</sup>).

VWF and FVIII circulate in a tight non-covalent complex in the circulation, and the affinity is estimated to be less than 1 nM<sup>44,45</sup>. The binding site for FVIII is located in the amino-terminal D'D3 region, spanning residues 764-1035<sup>46,47</sup>. In a recent study, Castro-Nunez and coworkers used an approach of mass spectrometer-assisted footprinting to discover that VWF residues Ser-764 and Lys-773 seem to be directly involved in the binding of FVIII<sup>48</sup>. The complementary binding site in FVIII has also been identified, involving residues at both the amino- and carboxyterminal regions of the FVIII light chain<sup>49,50</sup>.

The physiological relevance of VWF/FVIII complex formation is exemplified by the markedly reduced FVIII plasma levels in patients with undetectable VWF levels (VWD-type 3) or with a defect in the FVIII-interactive site of VWF (VWD-type 2N)<sup>51-53</sup>. Indeed, the majority of VWD-type 2N mutations are located in the region spanning residues 764-1035<sup>54</sup>, suggesting that these mutations affect FVIII binding directly by modulation of the FVIII interactive site.

VWF's protective function is related to several aspects<sup>55</sup>: (1) VWF stabilizes the heterodimeric structure of FVIII<sup>56</sup>; (2) VWF protects FVIII from proteolytic degradation by phospholipid-binding proteases like activated protein C and activated factor X (FXa)<sup>57,58</sup>; (3)



VWF interferes with binding of FVIII to negatively-charged phospholipid surfaces, which are for example exposed on activated platelets<sup>45</sup>; (4) VWF inhibits binding of FVIII to activated factor IX (FIXa), thereby denying FVIII access to the FX-activating complex<sup>59</sup>; (5) VWF shields FVIII from part of the inhibitory antibodies that may be generated during FVIII-replacement therapy in about 30% of the severe hemophilia A patients<sup>60-63</sup>; and (6) VWF prevents the uptake of FVIII by some cells, including dendritic cells<sup>64,65</sup>. In view of the role of dendritic cells in antigen-presentation to T-cells, this latter function may be of relevance regarding the immune-response towards FVIII that has been observed in the treatment of hemophilia patients. In several in vivo studies using mice, it has been shown that the addition of VWF reduces the immune-response towards FVIII<sup>63,66-68</sup>. This may suggest that the presence of VWF in therapeutic FVIII preparations may influence the development of inhibitory antibodies, although epidemiological studies have revealed conflicting data on this possibility<sup>69-73</sup>.

Apart from its protective role, VWF may also play a role in the targeting of FVIII to sites of vascular injury<sup>74</sup>. It should be noted that complex formation is not an absolute requirement for FVIII to reach the developing thrombus, as has been shown in studies using VWF-deficient mice<sup>75,76</sup>.

### **The classical functions of VWF: collagen binding**

Shortly after the identification of VWF as a plasma protein, its capacity to adsorb to collagens was reported<sup>77</sup>. Subsequent studies revealed that a dominant binding site for collagen in VWF is located in the VWF A3 domain involving a discontinuous epitope<sup>78-81</sup>. The A3 domain is able to interact with various types of collagen, including collagens I, III and

VI, and the complementary binding sequences in collagen I and III have been deciphered in detail<sup>82-85</sup>. The importance of the A3 domain in binding to collagen is supported by the finding that mutations in or around the collagen binding site may be associated with an increased bleeding tendency<sup>86-89</sup>.

An alternative binding-site for collagen in the VWF protein is located in the A1 domain, as has been demonstrated by various research groups<sup>83,90-93</sup>. However, opposite findings have been reported concerning the contribution of the A1-domain in facilitating VWF-platelet interactions under conditions of flow<sup>79,94</sup>. Nevertheless, it appears that some mutations in the A1 domain found in VWD patients may affect collagen binding, providing a rationale for the bleeding tendency in these patients<sup>95-98</sup>.

It should be noted that the bleeding tendency associated with mutations in the collagen binding site is usually mild, which is in line with the observation that a murine VWF variant with a defective collagen binding in the A3 domain displays no defect in the correction of the bleeding time in a tail clip-model for normal haemostasis<sup>99,100</sup>. In contrast, this mutant shows a strongly delayed occlusion time in a ferric chloride-induced model of vascular injury, suggesting that blocking VWF-collagen interactions could be a potential therapeutic approach in the treatment of arterial thrombosis<sup>100</sup>. This possibility has been explored in animal models for thrombosis, revealing that antibodies blocking VWF-collagen interactions are efficient in reducing the thrombotic tendency<sup>101,102</sup>.

Many in vitro studies revealed that VWF-collagen interactions are needed for the recruitment of platelets particularly under conditions of high shear rates (for reviews see Sixma et al.<sup>103</sup> and Nuyttens et al.<sup>104</sup>). In spite of this important function, defects in collagen binding are associated with but a mild bleeding tendency. The explanation for this apparent contradiction may originate from the redundancy in the process that mediates platelets

adheres to collagen. First, VWF contains multiple collagen-binding sites, which may perhaps compensate for each other under particular conditions. Second, platelets do contain other collagen receptors, such as  $\alpha 2\beta 1$  and Glycoprotein-VI (GpVI), that could allow them to interact with collagen in the absence of VWF<sup>105</sup>. It should be mentioned that both receptors do not resist high shear forces<sup>105</sup>, indicating that they are unable to function as a back-up system for VWF under high shear conditions. Finally, the subendothelial matrix comprises also other components that function as an adhesive surface for VWF, such as tenascin-C and laminin<sup>106,107</sup>. However, the binding sites for these proteins have not yet been identified.

From a structural point of view, the multimeric VWF protein attached to the collagen surface will undergo shear stress-induced conformational changes that lead to the exposure of the binding site for its platelet-receptor GpIb<sup>108</sup>. Interestingly, binding to collagen has also a secondary effect, in that it results in release of FVIII from the VWF molecule. This phenomenon was already recognized in the original manuscript that described the adsorption of VWF to collagen<sup>77</sup>, and was further elaborated by Bendetowicz and colleagues<sup>109</sup>. The reason for this release is yet unclear, but it could be that release of FVIII from collagen-bound VWF makes it more rapidly available for the coagulation cascade: VWF-bound FVIII is poorly activated by FXa/phospholipids, whereas VWF-free is efficiently activated by this complex<sup>57</sup>. Alternatively, this collagen-induced release could be a mechanism to prevent FVIII binding to VWF that is located in the subendothelial matrix, preventing undesired extravasation of FVIII<sup>109</sup>.

## **The classical functions of VWF: platelet binding**

A key function of VWF is to mediate the recruitment of platelets to sites of vascular injury, especially at those locations where collagen-binding platelet-receptors do not resist high shear forces. Interactions between platelets and VWF are mediated by two distinct platelet receptors: GpIb $\alpha$  and integrin  $\alpha$ Ib $\beta$ 3. GpIb $\alpha$  is part of the GpIb-IX-V complex that is abundantly expressed at the platelet surface<sup>110,111</sup>. Contacts between VWF and GpIb $\alpha$  require the VWF A1 domain, and the GpIb $\alpha$  interactive site has been elucidated at the atomic level using co-crystal structures of the VWF A1 domain and a soluble GpIb $\alpha$  fragment<sup>112-114</sup>. Mutations of residues in the VWF A1 domain that cover the interactive surface with GpIb $\alpha$  have indeed found to be associated with impaired VWF function and a bleeding tendency in patients with VWD-type 2M<sup>12</sup>. The VWF-GpIb $\alpha$  interaction is probably the best-studied aspect of VWF at both the functional and structural level, and its importance for the formation of platelet-rich thrombi has been extensively reviewed elsewhere (see for instance references<sup>108,115-117</sup>).

The binding site for  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 is located in the C1 domain of VWF (C4 domain according to the new annotation proposed by Zhou et al.<sup>41</sup>) and involves the classical Arg-Gly-Asp (RGD) recognition sequence for integrins. The function of the VWF- $\alpha$ Ib $\beta$ 3 interaction is related to the enforcement of platelet-platelet interactions as has been demonstrated in several in vitro studies<sup>118-121</sup>. However, since several other ligands (notably fibrinogen) are capable of doing so as well, this VWF function has long been thought to be redundant. This view is compatible with the notion that so far no patients having mutations in the  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 binding sequence have been reported. However, studies using a mouse model expressing a VWF mutant with defective  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 binding have forced us to change this view. Although mice expressing this mutant show normal correction of the bleeding time in a tail clip-model for

haemostasis, they are characterized by an impaired vessel occlusion time in a ferric chloride-induced model of vascular injury<sup>99,100</sup>. A similar reduction of vessel occlusion was observed in mice treated with antibodies against the RGD-sequence of VWF<sup>102</sup>. More detailed analysis of thrombus formation in these mice revealed that initial thrombus formation is unaffected. However, larger thrombi seem to dissolve as a result of the increased hydrodynamic forces to which the growing thrombus is exposed<sup>100,102</sup>. This strongly suggests that the VWF- $\alpha$ IIB $\beta$ 3 interaction is not redundant, but of physiological relevance with regard to the stabilization of the growing thrombus.

### **Novel aspects of VWF function: the molecular bus**

As described in the paragraph “The classical functions of VWF: FVIII binding”, VWF is particularly known as a carrier protein for FVIII in the circulation to maintain appropriate FVIII plasma levels. However, in recent years it has become clear that FVIII is not the only protein that circulates in complex with VWF in the circulation. Other examples of proteins that are associated with VWF in plasma include ADAMTS13<sup>122,123</sup>, osteoprotegerin<sup>124-126</sup>, angiopoietin-2 (Christophe OD, Cherel G, Lenting PJ, Denis CV; unpublished publications) and two members of the galectin family, galectin-1 and galectin-3<sup>127</sup>. It would not be surprising if this list of VWF-bound proteins will grow in the future. For instance, Turner & Moake recently published that several members of the complement family (i.e. C3, C5 and factors B, D, P H & I) attach to VWF that is freshly released from endothelial cells<sup>128</sup>. It seems reasonable to assume that at least some of these proteins remain associated to VWF upon release from the endothelial surface into the circulation.

Like for FVIII, galectin-1 and galectin-3 plasma levels were higher in wild-type mice compared to mice deficient for VWF<sup>127,129</sup>, suggesting that VWF is needed to stabilize galectin-1 and galectin-3 in the circulation. With regard to osteoprotegerin, a recent study revealed a positive correlation between VWF and osteoprotegerin levels in a cohort consisting of patients with cardiovascular disease and asymptomatic controls<sup>126</sup>. This correlation appeared particularly relevant in asymptomatic individuals without coronary calcification. These recent findings might suggest that VWF could play a similar protective role to stabilize osteoprotegerin in plasma. Of course, additional studies are needed to support this point of view. An opposite observation has been made regarding ADAMTS13 in that an inverse relationship between plasma levels of VWF and ADAMTS13 was reported<sup>130</sup>. In addition, ADAMTS13 levels were ~40% higher in patients lacking circulating VWF than in control individuals<sup>130</sup>. How VWF influences ADAMTS13 plasma levels remains to be determined. One possible explanation can be that VWF-bound ADAMTS13 is cleared in conjunction with VWF, which has a shorter half-life than ADAMTS13<sup>131,132</sup>.

The wide variety of proteins that are bound to VWF in the circulation raises a number of questions. First, how many passengers can be on the VWF bus at the same time? For FVIII and both galectins, we know that their plasma concentrations are about 100-fold lower than that of VWF, which suggests that they will not occupy all the places that are available. As for ADAMTS13, Feys et al. calculated that it circulates in complex with VWF in a stoichiometry of 1:250, also indicating that the majority of the VWF subunits remain non-occupied<sup>123</sup>. A second question is: what are the functional consequences of complex formation? VWF protects FVIII and may promote its targeting to sites of vascular injury. In contrast, FVIII may have the opposite effect on VWF, as it has been reported that the presence of FVIII promotes VWF degradation by ADAMTS13<sup>133</sup>. With regard to the galectins, angiopoietin-2 and

osteoprotegerin, the functional consequences of their binding to VWF have been investigated to a limited extent, if at all. In view of the large size of the VWF protein, it seems conceivable that VWF has a profound effect of the functionality of these proteins in that it may prevent the interaction with their natural ligand via sterical hindrance. However, many unknowns remain in this respect, and it would be of interest to explore the mutual functional effects between VWF and its passengers.

### **Novel aspects of VWF function: cell effector in the angiogenic process**

During the last two decades, more than 20 proteins have been identified that interact with VWF, several of them being involved in cellular signaling processes<sup>32</sup>. Consequently, VWF has been linked to other (patho)physiological processes than haemostasis as well, including angiodyplasia, tumor metastasis and smooth muscle cell proliferation (**Figure 2**; for recent reviews on these topics see references<sup>32,134,135</sup>). However, the mechanism by which VWF is linked to this processes is largely undefined. For each of the three conditions a brief overview of our current knowledge will be provided.

With regard to the angiogenic process, it has been found that the absence of VWF increases endothelial cell proliferation in vitro<sup>136</sup>. In line with this observation, VWF-deficient mice display an increased vessel density of the vasculature in the ears in comparison to VWF-expressing mice<sup>136</sup>, suggesting that VWF acts as a negative modulator of angiogenesis. The molecular basis of this modulatory effect is yet unclear. Results from the study by Starke and colleagues point to an effect of VWF on vascular endothelial growth factor (VEGF)-dependent angiogenesis, which proceeds via multiple intracellular and extracellular pathways dependent on  $\alpha V\beta 3$  and angiopoietin-2<sup>136</sup>. Given that both proteins are ligands for VWF, it

seems possible that VWF acts on the angiogenic process via interactions with both proteins. However, the endothelial cells contain several other VWF-binding proteins with pro- and anti-angiogenic properties, such as galectins-1 and -3<sup>137,138</sup>, connective tissue growth factor<sup>139</sup> and insulin-like growth factor binding protein-7<sup>140</sup>. This points to a complex role of VWF, able to affect the angiogenic process at different levels.

Irrespective of the precise mechanism, the link between VWF and angiogenesis seems to be of physiological relevance, given the relatively frequent occurrence of angiodysplasia in patients with VWD<sup>134,141</sup>. Angiodysplasia is characterized by vascular malformations resulting from an impaired angiogenic process, and is often clinically manifested via gastrointestinal bleedings<sup>142</sup>. Interestingly, the manifestation of angiodysplasia in VWD patients is observed more frequently in patients that lack high multimers, either because of hereditary defects<sup>141,143</sup> or because of acquired conditions, such as Heyde's syndrome or patients carrying circulatory assist devices<sup>144,145</sup>. Why there is this specific link with high molecular weight multimers is unclear. Perhaps it involves a mechanism that is similar to the interaction between VWF and GpIb $\alpha$ , which also is more efficient for the larger multimers compared to smaller variants. The possibility exists that VWF interacts in a multimer size-dependent manner with so far unidentified cellular receptors (expressed on endothelial cells or other cells in the vascular wall) that are involved in maintaining the vascular integrity. Solving this enigma would be of interest for the development of novel therapeutic means to manage this severe complication of VWD.



### **Novel aspects of VWF function: cell effector in smooth muscle cell proliferation**

Care should be taken in extrapolating the anti-proliferative effect of VWF towards VEGF-stimulated endothelial cells also to other cell types. As will be discussed in this section, VWF may also exert a proliferative effect, demonstrating that the cell effector function of VWF may be very much dependent on the local cellular environment. Upon damage of the vascular endothelial layer, VWF is able to penetrate into the intima of large peripheral vessels, where it is exposed to smooth muscle cells<sup>146-148</sup>. The deposition of VWF in the intima coincides with intimal thickening<sup>149</sup>, suggesting that VWF plays a role in the pathogenesis of intimal hyperplasia by promoting smooth muscle cell proliferation. This possibility is supported by in vitro experiments showing that VWF directly stimulates smooth muscle cell proliferation<sup>149</sup>. The transcriptional changes in smooth muscle cells that are being induced upon exposure to VWF have recently been unraveled, and involve multiple genes associated with growth factor stimulation<sup>150</sup>.

The effect of VWF-dependent smooth muscle cell proliferation is not only of relevance with regard to vascular damage, for instance as a consequence of an angioplasty procedure<sup>146,147</sup>, but may also be of importance in view of the hereditary disorder CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)<sup>150</sup>. The clinical phenotype of this disorder includes recurrent strokes and dementia. Analysis of brain sections of CADASIL-patients revealed that VWF is abundantly present in the brain vessels, particularly in the subarachnoid arteries that are characterized by concentric thickening of the media and adventitia<sup>150</sup>. The identification of VWF as a player in CADASIL-related smooth muscle cell proliferation could provide the basis for a novel therapeutic approach in the treatment of these patients.

### **Novel aspects of VWF function: cell effector in apoptosis**

The versatility of VWF is nicely illustrated by the notion that VWF is not only capable of stimulating cell proliferation but also by its capacity to induce cell death. Again, it is important to take into account the local cellular environment in this regard, since the apoptotic function of VWF is probably restricted to but a few cell types. First, it was shown that VWF is able to induce platelet apoptosis via interactions with GpIb $\alpha$ , thereby initiating the caspase-3, Bak and Bax-dependent apoptosis pathway<sup>151</sup>. The physiological consequences of this finding remain to be determined, but they could be of relevance for those conditions where there are enhanced VWF-platelet interactions without the need for thrombus formation. One such a condition could be VWD-type 2B, where gain-of-function mutations in the VWF A1 domain result in spontaneous VWF-platelet interactions.

Tumor cells are another cell type that might be susceptible to VWF-induced apoptosis. Unexpectedly, tumor cells were found to have a higher metastatic potential in VWF-deficient mice than in VWF-expressing control mice<sup>152</sup>. This higher metastatic potential appeared to be the result of a longer survival of living cells in the absence of VWF<sup>152</sup>. In vitro studies confirmed that VWF induced death of tumor cells<sup>152,153</sup>. The underlying mechanism of VWF-induced cell death remains unclear, although the observation that VWF-tumor cell interactions were mediated by  $\alpha$ V $\beta$ 3 suggest that VWF induces cell death via this integrin<sup>152</sup>. The capacity of VWF to induce tumor cell death in an  $\alpha$ V $\beta$ 3-dependent fashion was recently confirmed in an elegant study by Mochizuki and colleagues<sup>154</sup>. However, they also identified a series of tumor cells that was capable of escaping VWF-induced cell death. The explanation for this resistance against VWF-induced apoptosis was rather unexpected: they found that tumor cells are able to secrete a protease (ADAM-28) that is able to degrade VWF<sup>154</sup>. Thus, VWF negatively regulates tumor cell survival, and certain tumor cells have armed themselves

against VWF via the production of a protease that destroys the pro-apoptotic function of VWF.

### **Novel aspects of VWF function: a pro-inflammatory agent**

The adhesive nature of the VWF protein allows it to function as a landing platform for platelets. This raises the question whether this adhesive capacity is selective for platelets, or whether also other cells are able to adhere VWF. We have previously addressed this issue, and observed that leukocytes may adhere to immobilized VWF under conditions of low shear<sup>155</sup>. In the same study, we were able to identify PSGL-1 and  $\beta$ 2-integrins as potential counter-receptors for VWF at the leukocyte surface<sup>155</sup>. More recently, we also identified Siglec-5 as a leukocyte receptor that is able to interact with VWF, although we did not test whether Siglec-5 contributes to leukocyte-VWF interactions under conditions of flow<sup>156</sup>. Evidence is also accumulating from other studies that VWF may actively participate in leukocyte recruitment. First, platelet-decorated VWF strings at the cellular surface efficiently attract leukocytes, even under conditions of high shear stress<sup>157</sup>. Furthermore, VWF-platelet complexes play a crucial role in the extravasation of leukocytes upon an inflammatory response<sup>158</sup>.

The participation of VWF in the inflammatory response has been confirmed in several animal models for inflammation, such as atherosclerosis, wound healing, experimental allergic encephalomyelitis, and stroke<sup>159-162</sup>. Whether VWF plays a similar important role in the human pathology of these diseases is unclear, which could be related to the multi-factorial nature of such inflammatory conditions. For instance, VWF-deficient mice and pigs develop fewer atherosclerotic lesions compared to VWF-expressing animals, suggesting that VWF

could participate in attracting leukocytes to lesion sites<sup>161,163</sup>. However, human studies revealed conflicting information whether or not atherosclerosis is reduced in patients with VWD (recently reviewed by van Galen et al.<sup>164</sup>). One crucial difference that could explain the observed differences between humans and animals that lack VWF is that patients receive replacement therapy to replenish the reservoir of circulating VWF. As such they are less deficient in VWF compared to the animals.

### **Regulation of classic and new VWF functions: multimer size and shear stress**

In the circulation, VWF is exposed to many of its ligands, including platelets. Therefore, mechanisms need to be in place to prevent premature interactions between VWF and platelets in order to prevent undesired vessel occlusion<sup>165</sup>. On the other hand, for some ligands (such as FVIII) it is actually necessary that VWF is able to interact with them in a constitutive manner, without regulation that is too strict. From these two examples it becomes clear that the versatility of VWF is not only restricted to its functions, but also with regard to the regulation of these functions.

There are two dominant mechanisms in place that contribute to the regulation of VWF function. First, VWF is able to change conformation in response to shear stress<sup>166-168</sup>. In the normal circulation VWF is present as a globular protein, whereas exposure to increased shear forces drives the protein into an elongated conformation<sup>166-168</sup>. This change in conformation has a number of consequences<sup>169</sup>: (1) it results in decryption of the GpIb $\alpha$  binding site, allowing platelet binding<sup>108</sup>; (2) the cleavage site for ADAMTS13 becomes available<sup>170,171</sup>; (3) it exposes methionine residues that are sensitive to oxidation<sup>172</sup>; (4) it promotes disulfide bridge formation between cysteine-residues in the CK-domain<sup>173,174</sup>; (5) it enhances VWF

self-association<sup>175</sup>; and (6) it turns VWF into a ligand for its clearance receptor LRP1<sup>176</sup>. In contrast to these shear stress-dependent phenomena, the interactions between VWF and collagen or FVIII do not seem to require shear stress-induced conformations, as they already occur under static conditions.

Do these shear stress-induced conformational changes also affect the novel functions of VWF? In most cases, this does not seem to be the case. The effects of VWF on angiogenesis, smooth muscle cell proliferation and tumor cell death have usually been investigated *in vitro* under static conditions. Of course, this does not necessarily mean that shear stress will not affect these functions. However, additional studies are needed to get insight into the role of shear stress on novel VWF functions.

A second mechanism to regulate VWF function is to vary its multimer size, and several mechanisms are at hand to do so. One protein that contributes to the regulation of VWF multimer size is thrombospondin, which controls VWF multimer size via the introduction of new thiols<sup>177</sup>. Second, shear stress-induced self-association may enlarge the multimer size of VWF<sup>175</sup>. However, the most dominant regulator seems to be ADAMTS13, which is able to proteolytically degrade VWF via cleavages in the A2 domain between residues Tyr1605 and Met1606<sup>178</sup>. The mechanism by which ADAMTS13 recognizes and cleaves its substrate has been described in detail in an excellent review by Crawley and colleagues<sup>179</sup>. The importance of ADAMTS13 in the regulation of VWF multimer size in view of its hemostatic properties is evident from the thrombotic complications that occur in the absence of ADAMTS13, a disorder known as thrombotic thrombocytopenic purpura<sup>180-182</sup>. However, does ADAMTS13 also affect non-hemostatic functions of VWF? There are indications that this is indeed conceivable. First, we already mentioned that angiodysplasia is particularly associated with VWD patients that lack high molecular weight multimers, such as

in VWD-type 2A<sup>143</sup>. Apparently, an increased degradation of VWF interferes with the property of VWF to maintain the integrity of the vasculature. Second, increased leukocyte rolling on unstimulated veins and increased leukocyte adhesion in inflamed veins has been observed in mice deficient for ADAMTS13. Moreover, it has been found that the absence of ADAMTS13 exacerbates the inflammatory response in animal models for stroke and atherosclerosis<sup>159,183-185</sup>. Apparently, proteolytic degradation of VWF by ADAMTS13 downregulates the inflammatory potential of VWF. With regard to the effect of VWF on tumor cell death, the importance of multimer size is yet unclear. It should be noted that ADAM-28 reduced VWF multimer size via proteolysis at two distinct sites in the VWF protein, which coincides with a loss in apoptotic potential<sup>154</sup>. Since these sites are located away from the  $\alpha V\beta 3$ -recognition sequence (i.e. the RGD-motif), it seems conceivable that VWF multimer size plays a role in the interaction with tumor cells to initiate the apoptotic process.

## **Conclusion**

Forty years after its first purification from plasma, VWF still carries many mysteries. Its versatility is steadily being exposed but even its role in thrombosis, once thought to be well understood, is still eluding us. Indeed, the notion that a VWF-mutant unable to bind  $\alpha IIb\beta 3$  is protective against thrombosis in a ferric chloride-induced model for arterial thrombosis while it is without effect in a stroke model, is a perfect example of this constant reassessment that is forced upon us<sup>100,186</sup>. The possibility to target VWF in the management of thrombotic disorders should therefore be considered as a real option. With regard to the non-hemostasis functions of VWF, many avenues also remain to be explored. The combination of data

originating from both clinical and basic studies on VWF will no doubt be instrumental in expanding our knowledge of this intriguing protein.

### **Acknowledgements**

Financial support from Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV1-010-01) is gratefully acknowledged.

### **References**

1. Willebrand EA. Über hereditäre Pseudohämophilie. *Act Med Scand.* 1931;76(4-6):521-550.
2. Nilsson IM, Blomback M, Jorpes E, Blomback B, Johansson S. v. Willebrand's Disease and its Correction with Human Plasma Fraction 1-0. *Act Med Scand.* 1957;159(3):179-188.
3. Owen WG. Big piece, little piece or: yes, factor VIII is a protein. *J Thromb Haemostas.* 2005;3(9):1905-1909.
4. Bouma BN, Van Mourik JA. Unraveling the mystery of von Willebrand factor. *J Thromb Haemostas.* 2006;4(3):489-495.
5. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor: looking back and looking forward. *Thromb Haemost.* 2007;98(1):55-62.
6. Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, et al. Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science.* 1985;228(4706):1401-1406.
7. Lynch DC, Zimmerman TS, Collins CJ, et al. Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: authentication by a new method. *Cell.* 1985;41(1):49-56.
8. Verweij CL, Diergaarde PJ, Hart M, Pannekoek H. Full-length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than the mature vWF subunit. *EMBO J.* 1986;5(8):1839-1847.
9. Sadler JE, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Harlan JM, Titani K, Davie EW. Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(19):6394-6398.
10. Titani K, Kumar S, Takio K, et al. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry.* 1986;25(11):3171-3184.

11. James PD, Lillicrap D. von Willebrand disease: clinical and laboratory lessons learned from the large von Willebrand disease studies. *Am J Hematol.* 2012;87 Suppl 1:S4-11.
12. Goodeve AC. The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Rev.* 2010;24(3):123-134.
13. Schneppenheim R, Budde U. von Willebrand factor: the complex molecular genetics of a multidomain and multifunctional protein. *J Thromb Haemost.* 2011;9 Suppl 1:209-215.
14. Sadler JE. Low von Willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:106-112.
15. Margulis T, David M, Maor N, et al. The von Willebrand factor in myocardial infarction and unstable angina: a kinetic study. *Thromb Haemost.* 1986;55(3):366-368.
16. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med.* 1995;332(10):635-641.
17. Montalescot G, Philippe F, Ankri A, et al. Early increase of von Willebrand factor predicts adverse outcome in unstable coronary artery disease: beneficial effects of enoxaparin. French Investigators of the ESSENCE Trial. *Circulation.* 1998;98(4):294-299.
18. Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, et al. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Circulation.* 1999;100(7):736-742.
19. Whincup PH, Danesh J, Walker M, et al. von Willebrand factor and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *Eur Heart J.* 2002;23(22):1764-1770.
20. Morange PE, Simon C, Alessi MC, et al. Endothelial cell markers and the risk of coronary heart disease: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME) study. *Circulation.* 2004;109(11):1343-1348.
21. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2004;350(14):1387-1397.
22. Spiel AO, Gilbert JC, Jilma B. von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. *Circulation.* 2008;117(11):1449-1459.
23. Sanders YV, Eikenboom J, de Wee EM, et al. Reduced prevalence of arterial thrombosis in von Willebrand disease. *J Thromb Haemostas.* 2013; DOI:10.1111/jth.12194
24. Wieberdink RG, van Schie MC, Koudstaal PJ, et al. High von Willebrand factor levels increase the risk of stroke: the Rotterdam study. *Stroke.* 2010;41(10):2151-2156.
25. van Schie MC, Wieberdink RG, Koudstaal PJ, et al. Genetic Determinants of Von Willebrand Factor Plasma Levels and the Risk of Stroke: The Rotterdam Study. *J Thromb Haemost.* 2012;10(4):899-908.



26. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, et al. Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). *Am J Med.* 2002;113(8):636-642.
27. Lijfering WM, Rosendaal FR, Cannegieter SC. Risk factors for venous thrombosis - current understanding from an epidemiological point of view. *Br J Haematol.* 2010;149(6):824-833.
28. Smith NL, Rice KM, Bovill EG, et al. Genetic variation associated with plasma von Willebrand factor levels and the risk of incident venous thrombosis. *Blood.* 2011;117(22):6007-6011.
29. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):1777-1783.
30. Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet.* 1995;345(8943):152-155.
31. Campos M, Buchanan A, Yu F, et al. Influence of single nucleotide polymorphisms in factor VIII and von Willebrand factor genes on plasma factor VIII activity: the ARIC Study. *Blood.* 2012;119(8):1929-1934.
32. Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost.* 2012;10(12):2428-2437.
33. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6:217-246.
34. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:395-424.
35. Sadler JE. von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:24-27.
36. Wagner DD, Marder VJ. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells. Identification of a large precursor polypeptide chain. *J Biol Chem.* 1983;258(4):2065-2067.
37. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, Wagner DD. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest.* 1985;76(3):1102-1106.
38. Pannekoek H, Voorberg J. Molecular cloning, expression and assembly of multimeric von Willebrand factor. *Baillieres Clin Haematol.* 1989;2(4):879-896.
39. Springer TA. Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. *J Thromb Haemost.* 2011;9 Suppl 1:130-143.
40. Zhou YF, Eng ET, Nishida N, Lu C, Walz T, Springer TA. A pH-regulated dimeric bouquet in the structure of von Willebrand factor. *EMBO J.* 2011.
41. Zhou YF, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood.* 2012;120(2):449-458.

42. Johnson SS, Montgomery RR, Hathaway WE. Newborn factor VIII complex: elevated activities in term infants and alterations in electrophoretic mobility related to illness and activated coagulation. *Br J Haematol.* 1981;47(4):597-606.
43. Bauer JL, Miklos AZ, Thompson LD. Parotid gland solitary fibrous tumor: a case report and clinicopathologic review of 22 cases from the literature. *Head and neck pathology.* 2012;6(1):21-31.
44. Leyte A, Verbeet MP, Brodniewicz-Proba T, Van Mourik JA, Mertens K. The interaction between human blood-coagulation factor VIII and von Willebrand factor. Characterization of a high-affinity binding site on factor VIII. *Biochem J.* 1989;257(3):679-683.
45. Nesheim M, Pittman DD, Giles AR, et al. The effect of plasma von Willebrand factor on the binding of human factor VIII to thrombin-activated human platelets. *J Biol Chem.* 1991;266(27):17815-17820.
46. Foster PA, Fulcher CA, Marti T, Titani K, Zimmerman TS. A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1987;262(18):8443-8446.
47. Takahashi Y, Kalafatis M, Girma JP, Sewerin K, Andersson LO, Meyer D. Localization of a factor VIII binding domain on a 34 kilodalton fragment of the N-terminal portion of von Willebrand factor. *Blood.* 1987;70(5):1679-1682.
48. Castro-Nunez L, Bloem E, Boon-Spijker MG, et al. Distinct roles of Ser-764 and Lys-773 at the N terminus of von Willebrand factor in complex assembly with coagulation factor VIII. *J Biol Chem.* 2013;288(1):393-400.
49. Leyte A, van Schijndel HB, Niehrs C, et al. Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1991;266(2):740-746.
50. Saenko EL, Scandella D. The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von willebrand factor. *J Biol Chem.* 1997;272(29):18007-18014.
51. Tuddenham EG, Lane RS, Rotblat F, et al. Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease. *Br J Haematol.* 1982;52(2):259-267.
52. Morfini M, Mannucci PM, Tenconi PM, et al. Pharmacokinetics of monoclonally-purified and recombinant factor VIII in patients with severe von Willebrand disease. *Thromb Haemost.* 1993;70(2):270-272.
53. Nishino M, Girma JP, Rothschild C, Fressinaud E, Meyer D. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood.* 1989;74(5):1591-1599.

54. Jacquemin M. Factor VIII-von Willebrand factor binding defects in autosomal recessive von Willebrand disease type Normandy and in mild hemophilia A. New insights into factor VIII-von Willebrand factor interactions. *Acta haematologica*. 2009;121(2-3):102-105.
55. Lenting PJ, van Schooten CJ, Denis CV. Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII. *J Thromb Haemost*. 2007;5(7):1353-1360.
56. Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW. Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J Clin Invest*. 1977;60(2):390-404.
57. Koedam JA, Hamer RJ, Beeser-Visser NH, Bouma BN, Sixma JJ. The effect of von Willebrand factor on activation of factor VIII by factor Xa. *Eur J Biochem/FEBS*. 1990;189(2):229-234.
58. Fay PJ, Coumans JV, Walker FJ. von Willebrand factor mediates protection of factor VIII from activated protein C-catalyzed inactivation. *J Biol Chem*. 1991;266(4):2172-2177.
59. Lenting PJ, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K. Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. *J Biol Chem*. 1994;269(10):7150-7155.
60. Suzuki T, Arai M, Amano K, Kagawa K, Fukutake K. Factor VIII inhibitor antibodies with C2 domain specificity are less inhibitory to factor VIII complexed with von Willebrand factor. *Thromb Haemostas*. 1996;76(5):749-754.
61. Amano K, Arai M, Koshihara K, et al. Autoantibody to factor VIII that has less reactivity to factor VIII/von Willebrand factor complex. *Am J Hematol*. 1995;49(4):310-317.
62. Gensana M, Altisent C, Aznar JA, et al. Influence of von Willebrand factor on the reactivity of human factor VIII inhibitors with factor VIII. *Haemophilia*. 2001;7(4):369-374.
63. Shi Q, Kuether EL, Schroeder JA, et al. Factor VIII inhibitors: von willebrand factor makes a difference in vitro and in vivo. *J Thromb Haemostas*. 2012.
64. Lenting PJ, Neels JG, van den Berg BM, et al. The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*. 1999;274(34):23734-23739.
65. Dasgupta S, Navarrete AM, Bayry J, et al. A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(21):8965-8970.
66. Behrmann M, Pasi J, Saint-Remy JM, Kotitschke R, Kloft M. Von Willebrand factor modulates factor VIII immunogenicity: comparative study of different factor VIII concentrates in a haemophilia A mouse model. *Thromb Haemostas*. 2002;88(2):221-229.
67. Delignat S, Repesse Y, Navarrete AM, et al. Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A. *Haemophilia*. 2012;18(2):248-254.
68. Meeks SL, Cox CL, Healey JF, et al. A major determinant of the immunogenicity of factor VIII in a murine model is independent of its procoagulant function. *Blood*. 2012;120(12):2512-2520.

69. Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G, Ettinghausen CE, Tedgard U, van den Berg HM. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood*. 2007;109(11):4693-4697.
70. Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, et al. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N Eng J Med*. 2013;368(3):231-239.
71. Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, et al. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood*. 2006;107(1):46-51.
72. Goudemand J. Inhibitor development in haemophilia A: the role of von Willebrand factor/factor VIII concentrates. *Haemophilia*. 2007;13 Suppl 5:47-51.
73. Franchini M, Lippi G. Von Willebrand factor-containing factor VIII concentrates and inhibitors in haemophilia A. A critical literature review. *Thromb Haemostas*. 2010;104(5):931-940.
74. Kawasaki T, Kaida T, Arnout J, Vermeylen J, Hoylaerts MF. A new animal model of thrombophilia confirms that high plasma factor VIII levels are thrombogenic. *Thromb Haemost*. 1999;81(2):306-311.
75. Chauhan AK, Kisucka J, Lamb CB, Bergmeier W, Wagner DD. von Willebrand factor and factor VIII are independently required to form stable occlusive thrombi in injured veins. *Blood*. 2007;109(6):2424-2429.
76. Holmberg HL, Kjalke M, Karpf D, et al. High Affinity Binding of FVIII to VWF Is Not Required for the Haemostatic Effect of FVIII In Vivo. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2011;118:1182.
77. Nyman D. Interaction of collagen with the factor VIII antigen-activity - von Willebrand factor complex. *Thromb Res*. 1977;11(3):433-438.
78. Cruz MA, Yuan H, Lee JR, Wise RJ, Handin RI. Interaction of the von Willebrand factor (vWF) with collagen. Localization of the primary collagen-binding site by analysis of recombinant vWF a domain polypeptides. *J Biol Chem*. 1995;270(18):10822-10827.
79. Lankhof H, van Hoeij M, Schiphorst ME, et al. A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb Haemost*. 1996;75(6):950-958.
80. Romijn RA, Westein E, Bouma B, et al. Mapping the collagen-binding site in the von Willebrand factor-A3 domain. *J Biol Chem*. 2003;278(17):15035-15039.
81. Nishida N, Sumikawa H, Sakakura M, et al. Collagen-binding mode of vWF-A3 domain determined by a transferred cross-saturation experiment. *Nature Struc Biol*. 2003;10(1):53-58.
82. Santoro SA. Adsorption of von Willebrand factor/factor VIII by the genetically distinct interstitial collagens. *Thromb Res*. 1981;21(6):689-691.

83. Denis C, Baruch D, Kielty CM, Ajzenberg N, Christophe O, Meyer D. Localization of von Willebrand factor binding domains to endothelial extracellular matrix and to type VI collagen. *Arterioscler Thromb.* 1993;13(3):398-406.
84. Lisman T, Raynal N, Groeneveld D, et al. A single high-affinity binding site for von Willebrand factor in collagen III, identified using synthetic triple-helical peptides. *Blood.* 2006;108(12):3753-3756.
85. Brondijk TH, Bihan D, Farndale RW, Huizinga EG. Implications for collagen I chain registry from the structure of the collagen von Willebrand factor A3 domain complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(14):5253-5258.
86. Ribba AS, Loisel I, Lavergne JM, et al. Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen. *Thromb Haemost.* 2001;86(3):848-854.
87. Riddell AF, Gomez K, Millar CM, et al. Characterization of W1745C and S1783A: 2 novel mutations causing defective collagen binding in the A3 domain of von Willebrand factor. *Blood.* 2009;114(16):3489-3496.
88. Flood VH, Lederman CA, Wren JS, et al. Absent collagen binding in a VWF A3 domain mutant: utility of the VWF:CB in diagnosis of VWD. *J Thromb Haemost.* 2010;8(6):1431-1433.
89. Legendre P, Navarrete AM, Rayes J, et al. Mutations in the A3 domain of Von Willebrand factor inducing combined qualitative and quantitative defects in the protein. *Blood.* 2013;121(11):2135-2143.
90. Pareti FI, Fujimura Y, Dent JA, Holland LZ, Zimmerman TS, Ruggeri ZM. Isolation and characterization of a collagen binding domain in human von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1986;261(32):15310-15315.
91. Pareti FI, Niiya K, McPherson JM, Ruggeri ZM. Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III. *J Biol Chem.* 1987;262(28):13835-13841.
92. Mohri H, Yoshioka A, Zimmerman TS, Ruggeri ZM. Isolation of the von Willebrand factor domain interacting with platelet glycoprotein Ib, heparin, and collagen and characterization of its three distinct functional sites. *J Biol Chem.* 1989;264(29):17361-17367.
93. Hoylaerts MF, Yamamoto H, Nuyts K, Vreys I, Deckmyn H, Vermynen J. von Willebrand factor binds to native collagen VI primarily via its A1 domain. *Biochem J.* 1997;324 ( Pt 1):185-191.
94. Bonnefoy A, Romijn RA, Vandervoort PA, Van Rompaey I, Vermynen J, Hoylaerts MF. von Willebrand factor A1 domain can adequately substitute for A3 domain in recruitment of flowing platelets to collagen. *J Thromb Haemost.* 2006;4(10):2151-2161.

95. Morales LD, Martin C, Cruz MA. The interaction of von Willebrand factor-A1 domain with collagen: mutation G1324S (type 2M von Willebrand disease) impairs the conformational change in A1 domain induced by collagen. *J Thromb Haemostas*. 2006;4(2):417-425.
96. Flood VH, Gill JC, Christopherson PA, et al. Critical von Willebrand factor A1 domain residues influence type VI collagen binding. *J Thromb Haemostas*. 2012;10(7):1417-1424.
97. McKinnon TA, Nowak AA, Cutler J, Riddell AF, Laffan MA, Millar CM. Characterisation of von Willebrand factor A1 domain mutants I1416N and I1416T: correlation of clinical phenotype with flow-based platelet adhesion. *J Thromb Haemostas*. 2012;10(7):1409-1416.
98. Larsen DM, Haberichter SL, Gill JC, Shapiro AD, Flood VH. Variability in platelet- and collagen-binding defects in type 2M von Willebrand disease. *Haemophilia*. 2013;DOI:10.1111/hae.12117.
99. Marx I, Lenting PJ, Adler T, Pendu R, Christophe OD, Denis CV. Correction of bleeding symptoms in von Willebrand factor-deficient mice by liver-expressed von Willebrand factor mutants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):419-424.
100. Marx I, Christophe OD, Lenting PJ, et al. Altered thrombus formation in von Willebrand factor-deficient mice expressing von Willebrand factor variants with defective binding to collagen or GPIIb/IIIa. *Blood*. 2008;112(3):603-609.
101. Wu D, Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, et al. Inhibition of the von Willebrand (VWF)-collagen interaction by an antihuman VWF monoclonal antibody results in abolition of in vivo arterial platelet thrombus formation in baboons. *Blood*. 2002;99(10):3623-3628.
102. Navarrete AM, Casari C, Legendre P, et al. A murine model to characterize the antithrombotic effect of molecules targeting human von Willebrand factor. *Blood*. 2012;120(13):2723-2732.
103. Sixma JJ, van Zanten GH, Huizinga EG, et al. Platelet adhesion to collagen: an update. *Thromb Haemostas*. 1997;78(1):434-438.
104. Nuyttens BP, Thijs T, Deckmyn H, Broos K. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Res*. 2011;127 Suppl 2:S26-29.
105. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003;102(2):449-461.
106. Inoue O, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y. Redundant mechanism of platelet adhesion to laminin and collagen under flow: involvement of von Willebrand factor and glycoprotein Ib-IX-V. *J Biol Chem*. 2008;283(24):16279-16282.
107. Schaff M, Receveur N, Bourdon C, et al. Novel function of tenascin-C, a matrix protein relevant to atherosclerosis, in platelet recruitment and activation under flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(1):117-124.
108. Ruggeri ZM. Platelet adhesion under flow. *Microcirculation*. 2009;16(1):58-83.

109. Bendetowicz AV, Wise RJ, Gilbert GE. Collagen-bound von Willebrand factor has reduced affinity for factor VIII. *J Biol Chem.* 1999;274(18):12300-12307.
110. Lopez JA, Dong JF. Structure and function of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Curr Opin Hematol.* 1997;4(5):323-329.
111. Andrews RK, Shen Y, Gardiner EE, Dong JF, Lopez JA, Berndt MC. The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb Haemostas.* 1999;82(2):357-364.
112. Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, et al. Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science.* 2002;297(5584):1176-1179.
113. Dumas JJ, Kumar R, McDonagh T, et al. Crystal structure of the wild-type von Willebrand factor A1-glycoprotein Ibalpha complex reveals conformation differences with a complex bearing von Willebrand disease mutations. *J Biol Chem.* 2004;279(22):23327-23334.
114. Ruggeri ZM, Zarpellon A, Roberts JR, Mc Clintock RA, Jing H, Mendolicchio GL. Unravelling the mechanism and significance of thrombin binding to platelet glycoprotein Ib. *Thromb Haemostas.* 2010;104(5):894-902.
115. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor. *Curr Opin Hematol.* 2003;10(2):142-149.
116. Andrews RK, Berndt MC. Platelet adhesion: a game of catch and release. *J Clin Invest.* 2008;118(9):3009-3011.
117. Bergmeier W, Chauhan AK, Wagner DD. Glycoprotein Ibalpha and von Willebrand factor in primary platelet adhesion and thrombus formation: lessons from mutant mice. *Thromb Haemostas.* 2008;99(2):264-270.
118. Fressinaud E, Baruch D, Girma JP, Sakariassen KS, Baumgartner HR, Meyer D. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion to collagen involves platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa as well as glycoprotein Ib. *J Lab Clin Med.* 1988;112(1):58-67.
119. Beacham DA, Wise RJ, Turci SM, Handin RI. Selective inactivation of the Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) binding site in von Willebrand factor by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 1992;267(5):3409-3415.
120. Danton MC, Zaleski A, Nichols WL, Olson JD. Monoclonal antibodies to platelet glycoproteins Ib and IIb/IIIa inhibit adhesion of platelets to purified solid-phase von Willebrand factor. *J Lab Clin Med.* 1994;124(2):274-282.
121. Lankhof H, Wu YP, Vink T, et al. Role of the glycoprotein Ib-binding A1 repeat and the RGD sequence in platelet adhesion to human recombinant von Willebrand factor. *Blood.* 1995;86(3):1035-1042.
122. Zanardelli S, Chion AC, Groot E, et al. A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood.* 2009;114(13):2819-2828.

123. Feys HB, Anderson PJ, Vanhoorelbeke K, Majerus EM, Sadler JE. Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2009;7(12):2088-2095.
124. Zannettino AC, Holding CA, Diamond P, et al. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *J Cell Physiol.* 2005;204(2):714-723.
125. Shahbazi S, Lenting PJ, Fribourg C, Terraube V, Denis CV, Christophe OD. Characterization of the interaction between von Willebrand factor and osteoprotegerin. *J Thromb Haemost.* 2007;5(9):1956-1962.
126. Vinholt PJ, Overgaard M, Diederichsen AC, et al. An ELISA for the quantitation of von Willebrand Factor: Osteoprotegerin complexes in plasma. *Thromb Res.* 2013;DOI:10.1016/j.thromres.2013.03.001.
127. Saint-Lu N, Oortwijn BD, Pegon JN, et al. Identification of Galectin-1 and Galectin-3 as Novel Partners for Von Willebrand Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(4):894-901.
128. Turner NA, Moake J. Assembly and activation of alternative complement components on endothelial cell-anchored ultra-large von Willebrand factor links complement and hemostasis-thrombosis. *PLoS one.* 2013;8(3):e59372.
129. Denis C, Methia N, Frenette PS, et al. A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(16):9524-9529.
130. Mannucci PM, Capoferri C, Canciani MT. Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. *Br J Haematol.* 2004;126(2):213-218.
131. Denis CV, Christophe OD, Oortwijn BD, Lenting PJ. Clearance of von Willebrand factor. *Thromb Haemost.* 2008;99(2):271-278.
132. Furlan M, Robles R, Morselli B, Sandoz P, Lammle B. Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* 1999;81(1):8-13.
133. Cao W, Krishnaswamy S, Camire RM, Lenting PJ, Zheng XL. Factor VIII accelerates proteolytic cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(21):7416-7421.
134. Franchini M, Mannucci PM. Von Willebrand disease-associated angiodysplasia: a few answers, still many questions. *Br J Haematol.* 2013;161(2):177-182.
135. Franchini M, Frattini F, Crestani S, Bonfanti C, Lippi G. von Willebrand factor and cancer: A renewed interest. *Thromb Res.* 2013;131(4):290-292.
136. Starke RD, Ferraro F, Paschalaki KE, et al. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood.* 2011;117(3):1071-1080.
137. Liu FT, Yang RY, Hsu DK. Galectins in acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1253:80-91.



138. Le Mercier M, Fortin S, Mathieu V, Kiss R, Lefranc F. Galectins and gliomas. *Brain Pathol.* 2010;20(1):17-27.
139. Pi L, Shenoy AK, Liu J, et al. CCN2/CTGF regulates neovessel formation via targeting structurally conserved cystine knot motifs in multiple angiogenic regulators. *FASEB J.* 2012.
140. van Breevoort D, van Agtmaal EL, Dragt BS, et al. Proteomic screen identifies IGFBP7 as a novel component of endothelial cell-specific Weibel-Palade bodies. *J Proteome Res.* 2012;11(5):2925-2936.
141. Fressinaud E, Meyer D. International survey of patients with von Willebrand disease and angiodysplasia. *Thromb Haemost.* 1993;70(3):546.
142. Park SO, Wankhede M, Lee YJ, et al. Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest.* 2009;119(11):3487-3496.
143. Castaman G, Federici AB, Tosetto A, et al. Different bleeding risk in type 2 A and 2 M Von Willebrand disease: a two-year prospective study in 107 patients. *J Thromb Haemost.* 2012.
144. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, et al. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N Engl J Med.* 2003;349(4):343-349.
145. Slaughter MS. Hematologic effects of continuous flow left ventricular assist devices. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010;3(6):618-624.
146. Giddings JC, Banning AP, Ralis H, Lewis MJ. Redistribution of von Willebrand factor in porcine carotid arteries after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(10):1872-1878.
147. Bosmans JM, Kockx MM, Vrints CJ, Bult H, De Meyer GR, Herman AG. Fibrin(ogen) and von Willebrand factor deposition are associated with intimal thickening after balloon angioplasty of the rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(4):634-645.
148. De Meyer GR, Hoylaerts MF, Kockx MM, Yamamoto H, Herman AG, Bult H. Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(10):2524-2534.
149. Qin F, Impeduglia T, Schaffer P, Dardik H. Overexpression of von Willebrand factor is an independent risk factor for pathogenesis of intimal hyperplasia: preliminary studies. *J Vasc Surg.* 2003;37(2):433-439.
150. Zhang X, Meng H, Blaivas M, et al. Von Willebrand Factor permeates small vessels in CADASIL and inhibits smooth muscle gene expression. *Transl Stroke Res.* 2012;3(1):138-145.
151. Li S, Wang Z, Liao Y, et al. The glycoprotein Ibalpha-von Willebrand factor interaction induces platelet apoptosis. *J Thromb Haemost.* 2010;8(2):341-350.
152. Terraube V, Pendu R, Baruch D, et al. Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice. *J Thromb Haemost.* 2006;4(3):519-526.

153. Terraube V, Marx I, Denis CV. Role of von Willebrand factor in tumor metastasis. *Thromb Res.* 2007;120 Suppl 2:S64-70.
154. Mochizuki S, Soejima K, Shimoda M, et al. Effect of ADAM28 on Carcinoma Cell Metastasis by Cleavage of von Willebrand Factor. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(12):906-922.
155. Pendu R, Terraube V, Christophe OD, et al. P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor. *Blood.* 2006;108(12):3746-3752.
156. Pegon JN, Kurdi M, Casari C, et al. Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica.* 2012;97(12):1855-1863.
157. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Choi H, Moake JL, Dong JF. Platelets adhered to endothelial cell-bound ultra-large von Willebrand factor strings support leukocyte tethering and rolling under high shear stress. *J Thromb Haemost.* 2005;3(3):562-570.
158. Petri B, Broermann A, Li H, et al. von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. *Blood.* 2010;116(22):4712-4719.
159. Zhao BQ, Chauhan AK, Canault M, et al. von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke. *Blood.* 2009;114(15):3329-3334.
160. Denis CV, Andre P, Saffaripour S, Wagner DD. Defect in regulated secretion of P-selectin affects leukocyte recruitment in von Willebrand factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(7):4072-4077.
161. Methia N, Andre P, Denis CV, Economopoulos M, Wagner DD. Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood.* 2001;98(5):1424-1428.
162. Noubade R, del Rio R, McElvany B, et al. von-Willebrand factor influences blood brain barrier permeability and brain inflammation in experimental allergic encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2008;173(3):892-900.
163. Nichols TC, Bellinger DA, Tate DA, et al. von Willebrand factor and occlusive arterial thrombosis. A study in normal and von Willebrand's disease pigs with diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1990;10(3):449-461.
164. van Galen KP, Tuinenburg A, Smeets EM, Schutgens RE. Von Willebrand factor deficiency and atherosclerosis. *Blood Rev.* 2012;20(5):189-196.
165. Lenting PJ, Pegon JN, Groot E, de Groot PG. Regulation of von Willebrand factor-platelet interactions. *Thromb Haemost.* 2010;104(3):449-455.
166. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood.* 1996;88(8):2939-2950.

167. Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, et al. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(19):7899-7903.
168. Singh I, Shankaran H, Beauharnois ME, Xiao Z, Alexandridis P, Neelamegham S. Solution structure of human von Willebrand factor studied using small angle neutron scattering. *J Biol Chem*. 2006;281(50):38266-38275.
169. Denis CV, Lenting PJ. von Willebrand factor: at the crossroads of bleeding and thrombosis. *International J Hematol*. 2012;95(4):353-361.
170. Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, Wong WP, Springer TA. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science*. 2009;324(5932):1330-1334.
171. De Ceunynck K, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K. Unwinding the von Willebrand factor strings puzzle. *Blood*. 2013;121(2):270-277.
172. Fu X, Chen J, Gallagher R, Zheng Y, Chung DW, Lopez JA. Shear stress-induced unfolding of VWF accelerates oxidation of key methionine residues in the A1A2A3 region. *Blood*. 2011;118(19):5283-5291.
173. Ganderton T, Berndt MC, Chesterman CN, Hogg PJ. Hypothesis for control of von Willebrand factor multimer size by intra-molecular thiol-disulphide exchange. *J Thromb Haemost*. 2007;5(1):204-206.
174. Li Y, Choi H, Zhou Z, et al. Covalent regulation of ULVWF string formation and elongation on endothelial cells under flow conditions. *J Thromb Haemost*. 2008;6(7):1135-1143.
175. Yuan H, Deng N, Zhang S, et al. The unfolded von Willebrand factor response in bloodstream: the self-association perspective. *J Hematol & Oncol*. 2012;5:65.
176. Rastegarlarlari G, Pegon JN, Casari C, et al. Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood*. 2012;119(9):2126-2134.
177. Xie L, Chesterman CN, Hogg PJ. Control of von Willebrand factor multimer size by thrombospondin-1. *J Exp Med*. 2001;193(12):1341-1349.
178. Tsai HM. Mechanisms of microvascular thrombosis in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney international Supplement*. 2009(112):S11-14.
179. Crawley JT, de Groot R, Xiang Y, Luken BM, Lane DA. Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood*. 2011;118(12):3212-3221.
180. Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 1998;339(22):1585-1594.
181. Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 1998;339(22):1578-1584.

182. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001;413(6855):488-494.
183. Gandhi C, Khan MM, Lentz SR, Chauhan AK. ADAMTS13 reduces vascular inflammation and the development of early atherosclerosis in mice. *Blood*. 2012;119(10):2385-2391.
184. Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, et al. ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood*. 2010;115(8):1650-1653.
185. Khan MM, Motto DG, Lentz SR, Chauhan AK. ADAMTS13 reduces VWF-mediated acute inflammation following focal cerebral ischemia in mice. *J Thromb Haemost*. 2012;10(8):1665-1671.
186. De Meyer SF, Schwarz T, Deckmyn H, et al. Binding of von Willebrand factor to collagen and glycoprotein Ibalpha, but not to glycoprotein IIb/IIIa, contributes to ischemic stroke in mice--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(10):1949-1951.

## Legends

### Figure 1: Domain structure of VWF.

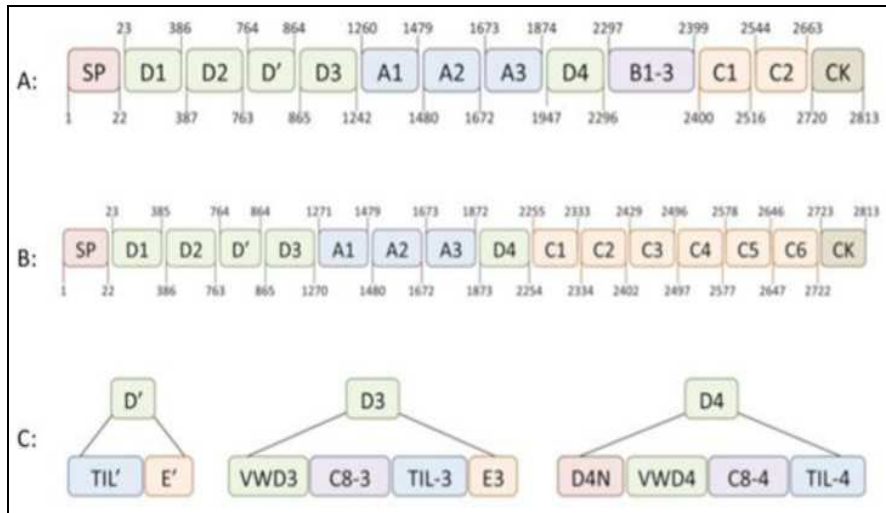
The molecular architecture of VWF is characterized by the presence of distinct domain structures. Panel A represents the arrangement of five different structures according to the original analysis of the VWF sequence (reviewed by Pannekoek & Voorberg)<sup>38</sup>. The numbering of the domain boundaries has been used in our laboratory in the previous years. Panel B shows the domain organization as has recently been proposed by Zhou et al.<sup>41</sup>. One striking difference with the original domain structure is the replacement of the B1-3 - C1 - C2 domain region by 6 homologous C-domains. In addition, their analysis revealed that the D-domains consist of various independent structures, which are highlighted in panel C. The D1, D2 and D3 domains each contain a VW-domain, a trypsin inhibitor-like (TIL)-structure, a C8 fold and an E module. The D' region lacks the VW domain and TIL-structure. The D4 domain lacks the E module, but instead comprises a unique sequence designated D4N.

### Figure 2: The functional diversity of VWF

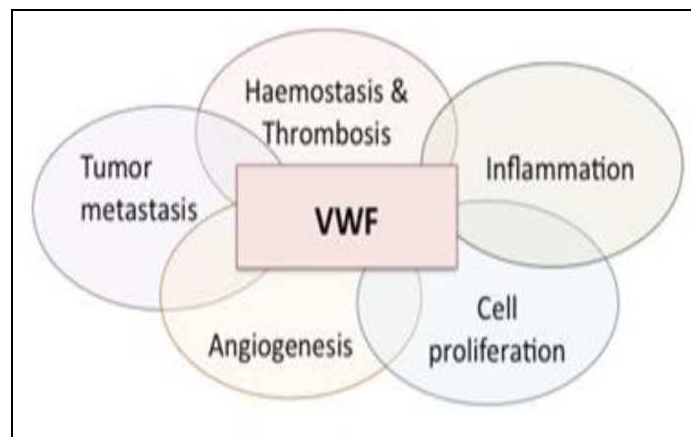
VWF is best known for its link with the hemostatic system, where it participates in the recruitment of platelets to the injured vessel wall and acts as a carrier protein for FVIII. The physiological relevance of this function is underscored by VWF being associated with bleeding problems (VWD and acquired VW syndrome) as well as thrombotic complications (myocard infarction, stroke and venous thrombosis). More recently it has been found that VWF is involved in other patho-physiological processes as well, such as tumor metastasis (inducing tumor cell death), angiogenesis (which could provide a rationale for the relatively frequent occurrence of angiodysplasia in VWD patients), cell

proliferation (associated with enhanced intima thickening after angioplasty and in CADASIL), and inflammatory processes (as observed in animal models for atherosclerosis, stroke, wound healing and experimental allergic encephalomyelitis).

**Figure 1**



**Figure 2**



## **Revue 2: Facteur von Willebrand et maladie de Willebrand : actualités**

Antoine Rauch, Claudine Caron, Sophie Susen, Jenny Goudemand. Revue Francophone des Laboratoires, Vol 2014 - N° 463 - juin 2014.

### **Résumé**

Le Facteur von Willebrand (VWF) est une glycoprotéine multimérique qui joue un rôle essentiel dans la formation du thrombus plaquettaire en présence de forces de cisaillement élevées. La maladie de Willebrand (MW) est une pathologie hémorragique, d'origine constitutionnelle ou acquise, résultant d'un déficit quantitatif ou qualitatif en VWF, et qui se caractérise par une grande hétérogénéité clinique et biologique, témoignant de la physiologie complexe du VWF. Si de nombreux progrès ont été réalisés concernant la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la MW, son diagnostic reste difficile et justifie un avis spécialisé. Au-delà de son rôle dans l'hémostase, le VWF pourrait jouer un rôle actif dans l'inflammation, l'angiogénèse, l'apoptose et la prolifération cellulaire.

### **Summary**

Von Willebrand Factor is a multimeric glycoprotein that plays an essential role in platelet-rich thrombi formation under high shear stress. The heterogeneity of Von Willebrand disease (VWD), a constitutional or acquired bleeding diathesis secondary to a quantitative or qualitative VWF deficiency, illustrates the complex physiology of this protein. Despite significant progresses in our comprehension of the numerous pathophysiological mechanisms underlying VWD, its diagnosis remains challenging and skill demanding in clinical practice. Besides its role in haemostasis, VWF has been recently involved with inflammation, angiogenesis, apoptosis and cell-proliferation paving the way for new approaches towards this intriguing protein.

## **Introduction**

La maladie de Willebrand (MW) est une pathologie hémorragique, d'origine constitutionnelle ou acquise, consécutive à un déficit quantitatif ou qualitatif en facteur Von Willebrand (VWF). La diversité des tests biologiques utilisés au laboratoire dans l'exploration d'un déficit en VWF témoignent de l'hétérogénéité de la MW en lien avec une physiopathologie complexe. Cet article propose une revue d'ensemble sur les multiples fonctions du VWF, la physiopathologie de la MW et la démarche diagnostique clinico-biologique en cas de suspicion de MW.

### **1. Physiologie du VWF**

#### **1.1. Synthèse, sécrétion et catabolisme du VWF plasmatique**

##### **1.1.1. Du gène à la protéine multimérique**

Le gène *VWF* (178 kb), localisé sur le bras court du chromosome 12 est un très long gène comportant 52 exons. Il est exprimé par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes où il code pour un précurseur monomérique de 2813 résidus, le pré-pro-VWF, constitué d'un peptide signal (22 aa), du propeptide (741 aa) et de la sous-unité mature (2050 aa). Après clivage du peptide signal, le pro-VWF (propeptide et sous-unité mature) est constitué d'une succession de différents domaines (A, B, C, D et CK) selon la séquence D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK<sup>1</sup>. Cette structure comporte des sites fonctionnels permettant la liaison du VWF au Facteur VIII (domaines D' et D3), à la glycoprotéine Iba plaquettaire (GpIba) (domaine A1), au collagène sous-endothélial (domaines A1 et A3) et à la glycoprotéine IIb/IIIa plaquettaire (GpIIb/IIIa) (domaine C4) (**Figure 1**). Le pro-VWF subit un ensemble complexe de modifications post-traductionnelles : dimérisation (réticulum endoplasmique), glycosylation, assemblage des dimères en multimères (appareil de Golgi). Les étapes de dimérisation et de multimérisation reposent sur des résidus cystéine, qui



permettent la formation de liaisons disulfures inter--chaînes entre les extrémités C- terminales des monomères pro-VWF (domaine CK) pour la dimérisation et N-terminales des dimères pro-VWF (domaine D3) pour le processus de multimérisation qui débute après clivage du propeptide (**Figure 2**). Après cette étape, le VWF revêt une forme hautement multimérisée (multimères de très haut poids moléculaire, VWF-THPM) correspondant à la répétition du tétramère de base et se trouve stocké avec le propeptide au sein des corps de Weibel-Palade (granules  $\alpha$  pour les plaquettes).

Pour simplifier la lecture, nous avons regroupé les abréviations dans un tableau I et la nomenclature du Comité Scientifique et de Standardisation de la Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase appliquée à la maladie de Willebrand et aux tests biologiques de diagnostic dans un tableau II.

### **1.1.2. Sécrétion et catabolisme plasmatique**

La sécrétion endothéliale est à la fois constitutive et régulée. Sous l'influence de stimuli variés (interleukines, thrombine, vasopressine, hypoxie, forces de cisaillement...), les corps de Weibel-Palade libèrent leur contenu de VWF-THPM dans le compartiment plasmatique. L'ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin domains-13), une métalloprotéase plasmatique, intervient alors immédiatement pour cliver ces formes très lourdes qualifiées parfois d'hyper-fonctionnelles car capables de se lier spontanément à la Gp1b plaquettaire. Ce clivage intervient sur une liaison peptique spécifique (Tyr1605-Met1606) localisé dans le domaine A2. Cette protéolyse est régulée *in vivo* par l'accessibilité du domaine A2, qui contient le site de clivage ainsi que des exosites d'interaction pour l'ADAMTS13<sup>2</sup>. Ce processus préserve les multimères de taille inférieure (VWF-HPM, VWF-IPM, VWF-BPM) qui adoptent une conformation globulaire rendant le domaine A2 cryptique. Le VWF circulant est ainsi constitué d'un mélange hétérogène de multimères dont la masse

moléculaire varie ainsi de 1 à près de 20 kD. La concentration du VWF et sa demi-vie plasmatique sont respectivement de l'ordre de 5 à 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  et de 12 à 20 heures. La clairance du VWF circulant a lieu dans le foie et la rate selon une cinétique indépendante de la taille des multimères. Au plan moléculaire, l'identification de récepteurs de clairance sur les macrophages et les cellules endothéliales constitue une nouvelle étape dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la clairance du VWF<sup>3</sup>.

### **1.1.3. Facteurs de variation du taux de VWF circulants**

La distribution physiologique des taux plasmatiques de VWF est large, de 50 à 200  $\text{UI.dL}^{-1}$ , reflétant la sensibilité du VWF à de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. Parmi ceux-ci, les polymorphismes d'expression génique décrits du *VWF* ne permettent pas à eux seuls d'expliquer la variabilité des taux de VWF plasmatique. Ceci suggère l'influence d'autres gènes dits « modulateurs », pour lesquels différents loci ont été déjà identifiés<sup>4</sup>. Le locus *ABO* est notamment responsable de près du tiers de la variabilité d'origine génétique du taux de VWF plasmatique<sup>5</sup>. La clairance sanguine du VWF varie selon la nature des antigènes de groupe sanguin ABH présents sur les chaînes N-glycosylées du VWF<sup>3</sup>. Les individus de groupe sanguin O ont ainsi une concentration de VWF plasmatique de 25 à 30% inférieures à ceux de groupe non O, en lien avec une clairance plus rapide du VWF circulant. Le taux de VWF varie avec l'âge (avec une diminution progressive de la naissance à l'âge de 1 an puis une élévation régulière) et l'ethnie (taux plus élevés chez le sujet noir). La sécrétion du VWF est augmentée par les hormones oestro-progestatives et la vasopressine. Des taux plus élevés de VWF plasmatique sont ainsi observés chez la femme en cas de contraception oestro-progestative ou de grossesse (taux multipliés par deux à trois au troisième trimestre). La sensibilité du VWF à la vasopressine est utilisée en thérapeutique via l'utilisation de son analogue synthétique, la desmopressine, pour le traitement des déficits quantitatifs modérés en

VWF. Le stress et l'exercice physique induisent également une élévation transitoire des taux de VWF. Les taux de VWF sont enfin modifiés par de nombreuses pathologies intercurrentes notamment inflammatoires (protéine de phase aiguë de l'inflammation), cardiaques ou hépatiques, avec parfois une très nette élévation du taux basal.

## **1.2. Fonctions pro-hémostatiques du VWF**

### **1.2.1. Adhésion et agrégation plaquettaire**

Le VWF joue un rôle essentiel dans la formation du thrombus artériel plaquettaire en cas de brèche vasculaire dans la microcirculation. En présence de forces de cisaillement élevées générées par l'écoulement laminaire du sang dans les artérioles, l'adhésion des plaquettes à la paroi vasculaire lésée est alors dépendante du VWF. Ces conditions rhéologiques induisent en effet un changement de conformation du domaine A1 essentiel pour l'exposition du site de liaison à la GpIb $\alpha$  plaquettaire. Le VWF lié au collagène sous-endothélial (domaine A3) constitue alors une surface adhésive permettant le recrutement des plaquettes au contact de la brèche vasculaire (étape d'adhésion plaquettaire). La liaison VWF-GpIb $\alpha$  initie parallèlement l'activation plaquettaire (signalisation « outside-in »). La plaquette activée expose secondairement à la surface de sa membrane le complexe GpIIb/IIIa sous une conformation capable de lier le VWF (signalisation « inside-out »). L'interaction VWF-GpIIb/IIIa consolide ainsi le thrombus plaquettaire via la formation de ponts inter-plaquettaires. Les fonctions pro-adhésive et pro-agrégante du VWF sont corrélées à la taille de ses multimères et par conséquent dépendantes de l'intégrité des VWF-HPM.

### **1.2.2. Transport du VIII**

Le Facteur VIII (FVIII) circule dans le sang lié au VWF, sa protéine chaperonne. Cette interaction, qui repose sur les domaines D' et D3 du VWF, protège le FVIII d'une clairance

accélérée ainsi que d'une inactivation par la PC activée. Un déficit secondaire en FVIII est ainsi observé lorsque le taux de VWF est diminué ou en cas de mutation altérant la capacité du VWF à fixer le FVIII (VWD de type 2N). La demi-vie plasmatique du FVIII peut alors être réduite jusqu' à 2 heures (au lieu de 12 à 20h en présence de VWF).

### **1.2.3. Thrombopoïèse**

Le VWF intervient à différents stades de la thrombopoïèse. Une anomalie de la maturation mégacaryocytaire a ainsi été reportée en présence de la mutation p.R1308P responsable d'une MW de type 2B<sup>5</sup>. Plus récemment, une étude suggère l'importance conjuguée du VWF et des forces de cisaillement pour la maturation terminale des pro-plaquettes en plaquettes discoïdes dans la circulation<sup>6</sup>.

## **2. Physiopathologie de la maladie de Willebrand**

### **2.1. Définition**

La maladie de Willebrand (MW) constitutionnelle est définie comme une pathologie hémorragique secondaire à un défaut génétique de la concentration, de la structure ou de la fonction du VWF indépendamment de la localisation de la mutation causale sur le gène *VWF* ou un autre gène<sup>7</sup>. Si la fréquence du déficit en VWF a pu être estimée à 1% de la population générale<sup>8</sup> la prévalence des formes symptomatiques de MW est estimée à 0.01%<sup>9</sup> et les formes les plus sévères (VWD type 3) sont beaucoup plus rares de l'ordre de 1 par million.

### **2.2. Classification**

La classification internationale repose sur une approche phénotypique et distingue les déficits quantitatifs partiels (type 1) ou complets (type 3), et les déficits qualitatifs (type 2). Le type 2 regroupe quatre sous-types : 2A, 2B, 2M et 2N<sup>7</sup> (**Tableau 3**). La transmission du déficit se

fait le plus souvent sur un mode autosomal dominant, à l'exception des types 3, des types 2N ainsi que de rares variants 2A qui sont à transmission récessive. La distribution des mutations sur le gène *VWF* est répartie sur l'ensemble du gène dans les types 1 et 3 alors que pour les types 2 les mutations sont localisées à proximité des sites fonctionnels d'interaction (**Figure 1**).

### **2.2.1. type 1**

Le type 1 est défini comme un déficit quantitatif partiel en VWF, se traduisant par une diminution harmonieuse des taux protéique (VWF:Ag) et fonctionnel (activité cofacteur de la ristocétine, VWF:RCo) ainsi que du FVIII. Malgré une transmission autosomale dominante, la pénétrance intra-familiale du phénotype hémorragique et la probabilité de retrouver une mutation sur le gène *VWF* varient selon l'intensité du déficit. Pour des taux de VWF:Ag <30 UI.dL<sup>-1</sup>, le génotypage objective habituellement une mutation à forte pénétrance (effet « dominant négatif ») affectant la sécrétion ou la clairance du VWF. Inversement, pour des taux compris entre 30 et 50 UI.dL<sup>-1</sup>, les rares mutations mises en évidence (mutations faux-sens ou altération de site d'épissage) révèlent une absence de co-ségrégation avec le phénotype hémorragique<sup>10</sup>. Ceci suggère l'influence de polymorphismes, encore non identifiés, sur des gènes modulateurs (hors locus *VWF*) mais également un probable chevauchement entre sujets sains (notamment de groupe O) et sujets atteints de MW type 1 modérée pour des taux compris entre 30 et 50 UI.dL<sup>-1</sup>.

### **2.2.2. type 2**

Le type 2 regroupe les variants définis par une anomalie qualitative du VWF à l'origine d'une interaction anormale avec les plaquettes (2A, 2B et 2M) ou le FVIII (2N). Dans le type 2A, la diminution de l'affinité du VWF pour la GpIb $\alpha$  plaquettaire est secondaire au déficit des

formes VWF-HPM et VWF-IPM. Des mécanismes variables, parfois associés, sont en cause selon la mutation : anomalies de dimérisation ou de multimérisation ; excès de protéolyse par l'ADAMTS13 et/ou clairance accélérée dans la circulation. Dans le type 2M, les VWF-HPM sont présents mais qualitativement anormaux avec une affinité diminuée pour la GpIb $\alpha$  (domaine A1) et/ou le collagène sous-endothélial (domaine A3). Dans le type 2B, l'anomalie princeps est un gain de fonction du VWF pour la GpIb $\alpha$ . Les anomalies observées sont classiquement attribuées à une adsorption spontanée du VWF sur les plaquettes (thrombopénie) et secondairement à une protéolyse accrue des VWF-HPM liés aux plaquettes par l'ADAMTS13. La physiopathologie de la thrombopénie est probablement plus complexe avec la description de mécanismes additionnels pour certaines mutations : anomalies de la mégacaryocytopoïèse <sup>5</sup> ou clairance accélérée des complexes VWF-plaquettes par les macrophages spléniques et hépatiques <sup>11</sup>. Le type 2N résulte d'une absence (ou franche diminution) de liaison du VWF au FVIII. Son mode de transmission est récessif. Ce variant se caractérise classiquement par un déficit plasmatique isolé en FVIII (homozygotes ou hétérozygotes composites) contrastant avec des taux normaux ou peu diminués de VWF (VWF:Ag et VWF:RCo).

Malgré cette classification, les études récentes de caractérisation de mutations *in vitro* confirment la persistance d'une grande hétérogénéité au sein même de chaque variant que ce soit dans le type 2A <sup>12</sup>, 2B <sup>13</sup> et 2M <sup>14</sup>. La mutation 2B p.V1316M (initialement décrite dans le syndrome de Montréal, une variété de thrombopénie familiale) induit à la fois une thrombopénie et une thrombopathie, caractérisée par une anomalie de l'activation de GpIIb/IIIa (signalisation « inside-out ») <sup>15</sup>. Cette découverte fournit un nouvel élément de compréhension de la sévérité du phénotype hémorragique associé à cette mutation 2B <sup>13</sup>.

### **2.2.3. type 3**

La MW de type 3, est la forme la plus sévère mais aussi la plus rare (sa prévalence est estimée à 1/10<sup>6</sup>). Sa transmission est récessive. Le phénotype hémorragique comporte souvent des hématomes et des hémarthroses en sus des habituelles manifestations hémorragiques cutanéomuqueuses. Elle est provoquée par un déficit quasi-total en VWF (VWF:Ag < 5 UI.dL<sup>-1</sup>) secondaire au génotype homozygote ou hétérozygote composite. Les mutations impliquées sont très variées (mutations non-sens, larges délétions, mutations de sites d'épissage...), mais distinctes de celles retrouvées dans la MW de type 1. Les apparentés hétérozygotes ne sont donc pas à considérer comme porteur d'une MW de type 1, et ils n'ont en effet pas de symptomatologie hémorragique particulière. En cas de déficit virtuellement complet en VWF (délétion complète homozygote), le traitement substitutif peut se compliquer d'une allo-immunisation anti-VWF associée à des manifestations anaphylactiques lors de l'apport exogène de VWF.

## **3. Diagnostic clinique et biologique de la MW**

### **3.1. Diagnostic clinique**

L'évaluation clinique doit préciser les antécédents hémorragiques personnels et/ou familiaux, spontanés et post-opératoires. La MW se manifeste par des hémorragies spontanées, le plus souvent cutanéomuqueuses (épistaxis, ménorragies, hémorragies du post-partum, hémorragies gastro-intestinales, gingivorragies), ou provoquées après un geste invasif ou une intervention chirurgicale. Des hématomes et des hémarthroses peuvent également être observés dans les formes associées à un déficit sévère en FVIII (MW type 3). L'expression clinique de la MW est très polymorphe. Les manifestations hémorragiques spontanées sont le plus souvent modérées dans le type 1 et le type 2N, dont le diagnostic est le plus souvent

effectué à l'occasion d'un bilan pré-opératoire. Inversement, des complications hémorragiques sévères (hémorragie du système nerveux central, amygdalienne ou digestive) sont parfois observées dans la MW de type 3 ou certains types 2. En raison de l'allégation fréquente d'une symptomatologie hémorragique mineure par un sujet sain, la sévérité du phénotype hémorragique doit être quantifiée à partir de la fréquence et du retentissement de chaque symptôme (transfusion, anémie ferriprive, reprise au bloc opératoire pour hémostase chirurgicale), au mieux via un questionnaire standardisé validé pour la MW, permettant l'obtention d'un score hémorragique <sup>16</sup>. La recherche d'un traitement susceptible d'interférer avec l'hémostase est impérative.

### **3.2. Examens biologiques**

Le bilan de 1ère intention en cas de suspicion de MW associe au minimum un dosage de FVIII, une exploration du VWF plasmatique associant dosage antigénique (VWF:Ag) et mesure de son activité fonctionnelle (mesure de l'activité cofacteur de la ristocétine ou test apparenté), et la réalisation d'une agrégation plaquettaire aux faibles concentrations de ristocétine (RIPA) si ce test est disponible. Le calcul des ratios FVIII/ VWF:Ag et VWF:RCo / VWF:Ag fait partie intégrante du bilan de dépistage ce qui implique que les dosages de FVIII, VWF Ag et VWF:RCo sont indissociables (**Figure 3**). La réalisation d'un temps d'occlusion sur PFA-100® peut s'avérer utile en raison de sa sensibilité au déficit en VWF, à l'exception du type 2N où il est normal. La réalisation d'une numération globulaire, d'un bilan de coagulation standard et d'un groupage ABO sont par ailleurs indispensables au diagnostic différentiel et à l'interprétation des dosages de VWF. Les résultats de FVIII, VWF:Ag et VWF:RCo sont exprimés en % d'un plasma normal ou en UI.dl<sup>-1</sup> si le plasma standard est titré par rapport au standard international [plasma standard FVIII/VWF (07/316)].



### 3.2.1. Dosage du FVIII

Le taux de FVIII (normal : 50 à 150 UI.dL<sup>-1</sup>) est mesuré sur plasma pauvre en plaquettes (PPP) le plus souvent par méthode chromométrique en 1 temps (FVIII:C). Un délai de moins de 2h est recommandé en cas de dosage sur PPP frais en raison de la thermolabilité du FVIII à température ambiante. Un déficit isolé en FVIII et/ou un ratio FVIII/VWF:Ag < 0.5-0.6 orientent soit vers une MW de type 2N soit vers une hémophilie A modérée ou mineure (ou un statut de conductrice d'hémophilie A). Le diagnostic différentiel nécessite l'étude de la capacité de liaison du VWF au FVIII (VWF:FVIII:B). Il existe des kits commerciaux permettant ce dosage mais il est préférable d'adresser cette analyse à des laboratoires disposant de l'expérience requise. En dehors des types 3 et 2N, l'intensité du déficit secondaire en VIII varie selon l'intensité du déficit en VWF:Ag. Le taux de FVIII peut être peu abaissé voire presque normal dans la MW de type 1 ou de type 2 (hors 2N). Un taux de FVIII normal a donc une mauvaise valeur prédictive négative pour le diagnostic de ces variants. Ceci exclut également le TCA comme test de dépistage d'une MW.

### 3.2.2. Dosage antigénique du VWF

La concentration plasmatique du VWF peut être mesurée sur PPP par des méthodes immunologiques variées: immuno-enzymatique (ELISA ou ELFA), immunoturbidimétrique (LIA) ou immunochimiluminescence (Acustar, IL). Cependant, seules les méthodes ELISA et IL ont une sensibilité suffisante pour permettre un diagnostic différentiel entre VWD type 1 sévère et VWD type 3 (**Tableau 4**). Le taux de VWF:Ag peut être pratiquement normal pour certains variants de type 2. Ceci justifie systématiquement, en parallèle du dosage du VWF:Ag, une mesure de l'activité fonctionnelle du VWF plasmatique.

### 3.2.3. Mesure de l'activité fonctionnelle du VWF (liaison aux plaquettes)

#### Activité cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo)

La mesure de l'activité cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo) reste la méthode de référence pour évaluer l'activité fonctionnelle du VWF. Ce test évalue la capacité du VWF (au sein d'un PPP) à interagir avec des plaquettes normales en conditions statiques. L'absence de forces de cisaillement, essentielle à l'interaction VWF-GpIb $\alpha$  *in vivo*, est contournée *in vitro* par l'utilisation de ristocétine, un composé (anciennement utilisé comme antibiotique) modifiant la charge électro statique du VWF, induisant une agglutination VWF-dépendante des plaquettes. La méthode originale, basée sur l'utilisation de ristocétine et de plaquettes commerciales fixées, présente plusieurs déclinaisons selon le mode de quantification des agglutinats VWF-plaquettes : lecture semi-quantitative sur lame, sur agrégomètre ou sur automate.

Ces techniques sont caractérisées par une grande variabilité inter-laboratoire et un seuil de quantification trop élevé (10 UI.dl<sup>-1</sup> environ) pour permettre la distinction entre MW type 1 (sévère) et type 3. Les performances analytiques de tests dérivés type test (HemosIL Acustar VWFRCo IL) évaluant l'interaction du VWF avec un fragment recombinant GpIb $\alpha$  en présence de ristocétine (dosage par chimiluminescence sur automate) sont plus satisfaisantes (**Figure 5**). Cependant, l'existence de polymorphismes situés sur les sites de liaison de la ristocétine du domaine A1 du VWF, constitue une limite intrinsèque à l'ensemble des tests basés sur l'usage de la ristocétine. Ces polymorphismes, identifiés chez des sujets d'origine afro-américaine, peuvent induire un taux artificiellement bas de VWF:RCo en dépit d'une capacité de liaison normale du VWF à la GpIb $\alpha$  <sup>17</sup>.

### **Autres tests dit « Willebrand activité » évaluant la liaison VWF-GpIb $\alpha$ (VWF:Act)**

Il est aussi possible d'évaluer biologiquement l'interaction VWF-GpIb $\alpha$  en l'absence de ristocétine et de plaquettes. Le « VWF:Act » (HemosIL VWF Activity®, IL) est une technique immunoturbidimétrique utilisant des billes de latex recouvertes d'un anticorps monoclonal anti-VWF reconnaissant un épitope fonctionnel pour la liaison à la GpIb $\alpha$  (domaine A1). Ce test s'avère performant dans le cadre du dépistage de la VWD (CV < 10%) mais il ne permet cependant pas une distinction fiable entre MW type 1 et MW type 2 lors du typage, qui nécessite alors la réalisation d'un autre test fonctionnel <sup>18</sup>. Le « VWF:Ac » (Innovance VWF:Ac®, Siemens) est une technique immunoturbidimétrique automatisée utilisant une protéine recombinante GpIb $\alpha$  mutée caractérisée par une hyper-affinité pour le VWF (induction par mutagenèse dirigée de 2 mutations pseudo-MW à l'origine d'« un gain de fonction » pour le VWF). Ce dernier test semble intéressant à la fois pour le dépistage et le typage de la MW avec une bonne discrimination entre MW type 1 et type 3 ainsi qu'entre MW type 1 et type 2 <sup>19</sup> (**Figure 5**).

En conclusion, le dosage du VWF:RCo reste le test fonctionnel de référence malgré des performances analytiques et diagnostiques inférieures aux tests récents qui s'affranchissent des contraintes de l'utilisation de ristocétine et de plaquettes. Ces derniers sont cependant encore absents de la nomenclature internationale, dans l'attente d'une confirmation de leurs performances sur de plus grandes séries.

### **Importance du dosage combiné VWF:Ag et VWF:RCo (ou VWF:Act)**

Un dosage antigénique ou fonctionnel normal ne permet pas d'exclure une MW. Ils peuvent en effet être tous deux augmentés dans des circonstances cliniques variées (cf physiologie). Dans ces situations, le dosage combiné permet d'évoquer malgré tout une MW lorsqu'il met en évidence une dissociation significative (ratio VWF:RCo/VWF Ag < 0.7). La dernière

recommandation (journal officiel du 11 juin 2013) de l'Union Nationale des Caisses d'Assurance Maladie, concernant le bilan de 1<sup>ère</sup> intention à effectuer en cas de suspicion de MW, est sans doute trop restrictive à cet égard. Elle préconise le dosage isolé du VWF:RCo dans un 1<sup>er</sup> temps et celui du VWF:Ag secondairement en cas de diminution du VWF:RCo. Le risque d'une telle approche est de méconnaître le diagnostic de certaines formes de MW, notamment de type 2.

#### **3.2.4. RIPA**

Ce test évalue l'agrégation d'un PRP en présence de concentrations variables de ristocétine. Ce test est contraignant car il doit être réalisé sur plasma frais (<2h) et nécessite un contrôle interne propre à chaque laboratoire. L'agglutination plaquettaire chez le sujet sain n'est observée qu'à partir de concentrations de ristocétine d'environ 1 à 1,2 mg.mL<sup>-1</sup>. Inversement, des concentrations plus faibles de ristocétine (<0,8 mg.mL<sup>-1</sup>) sont insuffisantes pour induire l'agglutination de plaquettes en présence de VWF et de ristocétine. Certaines anomalies du VWF peuvent induire une hyperaffinité du VWF aux plaquettes se traduisant par une agglutination anormale observée pour de faibles concentrations de ristocétine. Cette agrégation paradoxale pour de faibles concentrations de ristocétine s'observe dans 2 pathologies distinctes : la MW de type 2B et la pseudo-maladie de Willebrand (pseudo-MW). Auparavant, le RIPA n'était réalisé qu'en 2<sup>e</sup> intention en présence d'arguments biologiques : thrombopénie ou agrégats plaquettaires. Des données récentes remettent en cause cette approche, soulignant l'intérêt du RIPA dès le bilan de 1<sup>ère</sup> intention afin de ne pas méconnaître certains variants 2B pour lesquels la numération plaquettaire et la triade VWF:Ag/VWF:RCo/FVIII:C s'avèrent parfois normales <sup>13</sup>.

### 3.2.5. limites du bilan de dépistage

Le bilan de dépistage manque parfois de sensibilité pour le diagnostic de MW constitutionnelle en raison de la variabilité intrinsèque des taux de VWF, de la présence d'une pathologie intercurrente inflammatoire et de l'imprécision du VWF:RCo. A l'opposé, la mise en évidence d'un déficit modéré en VWF (entre 30 et 50 UI.dL<sup>-1</sup>) est fréquente, notamment chez les sujets de groupe O, et ne doit pas faire poser hâtivement un diagnostic de MW. Les dernières recommandations pour le diagnostic de la MW de type 1 insistent ainsi sur le respect de la triade: antécédents hémorragiques depuis l'enfance, antécédents hémorragiques familiaux et taux de VWF diminué (< 2 déviation standard par rapport à une population saine appariée pour le groupe sanguin ABO) <sup>20</sup>. Selon une approche bayésienne, le diagnostic de MW de type 1 est peu probable en cas de taux de VWF  $\geq 40$  UI/dl, excepté en présence d'un score hémorragique anormal ou de la présence d'un taux de VWF < 40 UI/dl chez au moins un apparenté au 1<sup>er</sup> degré <sup>21</sup>.

Le bilan de 1<sup>ère</sup> intention manque également parfois de sensibilité pour le diagnostic de certaines formes acquises de maladies de Willebrand (acquired von Willebrand Syndrome), d'étiologies variées : hématologiques (dysglobulinémie monoclonale primitive ou secondaire, syndrome myélo ou lymphoprolifératif), immunologiques (lupus erythemateux systémique), cardio-vasculaires (valvulopathies, assistances ventriculaires mécaniques), néoplasiques ou endocriniennes (hypothyroïdie) <sup>22</sup>. Une symptomatologie hémorragique cutanéomuqueuse (épistaxis, hémorragie gastro-intestinale [GI]...) d'apparition récente et de caractère récidivant est évocatrice, a fortiori si l'interrogatoire et/ou l'examen clinique retrouve une pathologie déjà décrite en association avec un syndrome de Willebrand acquis. Un tel contexte justifie alors un bilan VWF exhaustif associant une étude de la distribution multimérique, un dosage du propeptide, la recherche d'un auto-anticorps neutralisant (tests de neutralisation en VWF:RCo ou VWF:CB) ainsi qu'un bilan à visée étiologique.

### **3.3. Examens biologiques spécialisés**

Le typage, essentiellement phénotypique, se base sur un ensemble de tests biologiques dont la hiérarchisation varie en fonction des résultats du bilan de dépistage. La biologie moléculaire, non systématique, s'avère intéressante dans certaines indications.

#### **3.3.1. Typage phénotypique (figure 3)**

##### **1) Suspicion MW type 3**

Cette forme est la plus rare, la plus sévère mais aussi la plus facile à identifier. Elle entraîne un déficit quasi complet en VWF (VWF:Ag et VWF:RCo indosables, le FVIII est bas <5% mais jamais nul). Certaines formes de MW sévères de type 1 peuvent avoir quasiment la même traduction. La confirmation diagnostique d'une MW de type 3 reposera sur l'absence de protéine détectable en méthode ELISA et le génotypage.

##### **2) Suspicion MW type 2N**

Le diagnostic différentiel entre VWD de type 2N et hémophilie A mineure repose sur la réalisation d'un test ELISA de liaison du VWF au FVIII (VWF:FVIII<sub>B</sub>). En cas de MW de type 2N (affection récessive) ce test montre une liaison du VWF au FVIII nulle ou très diminuée. Les sujets atteints de MW 2N sont homozygotes pour une mutation 2N ou hétérozygotes composites (habituellement 2N – allèle nul). Une diminution plus limitée évoque un statut d'hétérozygote 2N. L'hétérozygotie 2N (liaison diminuée de 50%) est fréquente dans la population (prévalence de 0.5%) et n'a aucune conséquence sur le plan hémorragique car elle n'induit pas de déficit en FVIII. Par conséquent un déficit isolé en FVIII ne peut être imputé à une hétérozygotie 2N isolée. Cette situation nécessite le génotypage du gène codant pour le FVIII (*F8*) à la recherche d'une hémophilie A (ou d'un statut de conductrice d'hémophilie A).

### 3) Suspicion MW type 2B ou pseudo-MW

La mise en évidence d'une agrégation paradoxale aux faibles concentrations de ristocétine au RIPA ( $<0.8 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) ou d'une hyperfixation du VWF plasmatique du patient à un fragment recombinant de GpIb $\alpha$  pour de faibles concentrations de ristocétine témoignent d'un gain de fonction de la liaison VWF-GpIb $\alpha$  plaquettaire. Un séquençage de l'exon 28 du *VWF* (et si négatif du gène *GPIBA*) est privilégié pour le diagnostic différentiel MW type 2B/pseudo-MW. Les tests traditionnels de RIPA croisés mesurant l'agrégation à la ristocétine de mélanges plaquettes normales/PPP malade (MW type 2B si absence d'agglutination) ou plaquettes malades/PPP témoin (pseudo-MW si pas d'agglutination) peuvent en effet manquer de sensibilité.

### 4) VWF:RCo et/ou VWF:Ag $< 30 \text{ UI.dL}^{-1}$

La probabilité d'une MW est élevée en cas de taux de VWF:Ag ou VWF:RCo (ou VWF:Act) inférieur à  $30 \text{ UI.dL}^{-1}$ . Dans cette situation ou en cas de diminution isolée du ratio VWF:RCo/VWF:Ag ( $<0.6-0.7$ ), un bilan exhaustif est nécessaire. Celui-ci comporte l'évaluation de la liaison du VWF au collagène (VWF:CB), l'analyse du profil multimérique et un RIPA si celui-ci n'a pas été réalisé lors du bilan de 1<sup>ère</sup> intention. Un ratio VWF:RCo/VWF:Ag normal, un RIPA négatif et un profil multimérique normal ou sub-normal orientent vers une MW de type 1 (ou de MW de type 2M). Le dosage du propeptide (VWFpp) par méthode ELISA permet secondairement d'identifier les formes de MW de type 1 associées à une clairance accélérée, pour lesquelles la réponse à la desmopressine est transitoire. Un ratio VWF:RCo/VWF:Ag diminué ( $< 0.6-0.7$ ) suggère une anomalie de la liaison VWF-GpIb $\alpha$  (MW type 2A, 2B ou éventuellement 2M). Un RIPA positif, oriente d'emblée le diagnostic vers un type 2B (ou une pseudo-MW). L'association [diminution des VWF-HPM/ thrombopénie] est classique dans le 2B mais inconstante selon la mutation en cause <sup>13</sup>. En cas de négativité du RIPA, le profil multimérique permet généralement la

distinction entre MW type 2A (absence des VWF-HPM) et MW type 2M (VWF-HPM présents mais qualitativement anormaux). La capacité de liaison du VWF au collagène (VWF:CB), mesurée en ELISA, est diminuée parallèlement au VWF:RCo dans le type 2A secondairement au déficit quantitatif en VWF-HPM et pour certains variants 2M (mutations domaine A1). Inversement, un 2<sup>e</sup> groupe de MW de type 2M (mutations domaine A3) se caractérise par une diminution isolée de la liaison du VWF au collagène (VWF:CB) sans anomalie associée de la liaison à la GpIb $\alpha$ .

### **3.3.2. Typage moléculaire**

Le génotypage du *VWF* est utile au diagnostic différentiel entre MW type 3/ MW type 1 (forme sévère), MW type 2N/ hémophilie A, MW type 2B/ pseudo-MW et MW type 1/patient transmetteur MW type 3. Dans la MW de type 3, il est utile au conseil génétique, à un éventuel diagnostic prénatal et à l'identification des patients à risque d'allo-immunisation et de réactions de type anaphylactiques lors d'un traitement par concentré de VWF.



## **4. Nouvelles perspectives**

Au-delà de son rôle essentiel dans l'hémostase, le VWF est impliqué dans des processus pathologiques variés : inflammation, angiogénèse, prolifération cellulaire et apoptose [voir pour revue détaillée <sup>23</sup>).

### **4.1. rôle pro-inflammatoire du VWF :**

#### **VWF et inflammation tissulaire**

Le VWF joue un rôle actif dans la réaction inflammatoire, qui ne se limite pas à l'adressage de la P-sélectine aux corps de Weibel-Palade, étape essentielle à l'expression membranaire de ce récepteur endothélial impliqué dans le recrutement leucocytaire. La formation de complexes VWF-plaquettes à la surface de l'endothélium activé semble ainsi jouer un rôle important dans le recrutement des leucocytes circulants sur le site de l'inflammation. Ces complexes VWF-plaquettes favoriseraient les étapes de rolling et d'adhésion leucocytaire <sup>24,25</sup> et secondairement l'extravasation leucocytaire <sup>25</sup>. Ces observations concordent avec la découverte de plusieurs récepteurs membranaires leucocytaires pour le VWF (PSGL-1,  $\beta$ 2 intégrine et Siglec-5) <sup>23</sup> et avec une étude récente qui suggère l'intérêt d'une inhibition ciblée du VWF pour réduire l'inflammation tissulaire *in vivo*. Dans un modèle murin de vascularite leucocytoclasique induite par des dépôts de complexes immuns (modèle d'Artus), l'utilisation d'un anticorps polyclonal anti-VWF permet en effet une nette régression des lésions inflammatoires cutanées via l'inhibition de l'extravasation leucocytaire. De façon notable, cet effet anti-inflammatoire ne s'accompagne pas de manifestations hémorragiques puisque l'anticorps anti-VWF n'interfère pas avec les sites fonctionnels du VWF nécessaires à l'hémostase <sup>26</sup>.

## VWF & immuno-thrombose

Le paradigme d'immuno-thrombose attribue un rôle essentiel à l'inflammation dans les processus thrombotiques veineux <sup>27</sup> et artériels <sup>28</sup>. L'implication récente du VWF dans la physiopathologie de la maladie thrombo-embolique veineuse et de l'infarctus cérébral, via ses propriétés pro-thrombotiques et pro-inflammatoires, témoigne de cette interconnexion entre thrombose et inflammation. Un modèle murin de thrombose veineuse profonde (TVP), induite par une sténose partielle de la veine cave inférieure, suggère ainsi l'implication du VWF à différentes étapes du processus. L'interaction VWF-GpIb $\alpha$  serait essentielle au recrutement des plaquettes et à l'interaction entre plaquettes et cellules de l'immunité innée observée à la phase initiale de la TVP <sup>29</sup>. Secondairement, l'interaction entre VWF et les « neutrophil extracellular traps » (NETs), sécrétés par les leucocytes activés, favoriserait la propagation du processus thrombotique <sup>27</sup>.

La lutte contre l'inflammation constitue également un nouvel axe de recherche dans l'infarctus cérébral afin de diminuer les phénomènes thrombo-inflammatoires à l'origine de lésions d'ischémie-reperfusion (I/R), sur lesquels la thrombolyse semble peu efficace <sup>30</sup>. Plusieurs modèles animaux identifient le VWF comme une cible candidate pour limiter l'inflammation à l'origine de ces lésions I/R. La ligature puis la reperfusion de l'artère cérébrale moyenne induit ainsi un infarctus cérébral moins sévère chez les souris génétiquement déficientes en VWF (VWF<sup>-/-</sup>) vs contrôles. Inversement, la restauration d'une synthèse endogène de VWF par injection hydrodynamique de VWF sauvage à une souris VWF<sup>-/-</sup> restaure sa susceptibilité à l'infarctus cérébral <sup>31</sup>. Les formes VWF-THPM semblent plus particulièrement en cause car l'ADAMTS13 protège des lésions d'I/R et diminue la taille de l'infarctus dans ces modèles animaux <sup>32</sup>.

#### **4.2. Rôle anti-angiogénique du VWF : un lien entre angiodyplasie et MW?**

Le VWF régule négativement l'angiogénèse. Dans un modèle de culture endothéliale (HUVEC) où l'expression du VWF est inhibée par siRNA, l'absence de VWF endothélial inhibe la prolifération cellulaire et l'angiogénèse dépendantes du VEGF-R2, l'expression membranaire de l'intégrine  $\alpha\beta3$  et augmente la libération endothéliale d'angiopoïétine 2<sup>33</sup>. De façon similaire, l'étude de souris VWF<sup>-/-</sup> objective une augmentation conjointe de l'angiogénèse dans un modèle sous-cutané de Matrigel et de la densité capillaire auriculaire, par rapport aux souris sauvages<sup>33</sup>. A la lumière de la fréquence élevée des hémorragies GI sur angiodyplasies dans la MW, cette étude a soulevé un vif intérêt, suggérant un éventuel lien de causalité entre MW et angiodyplasie, malformation vasculaire attribuée à une anomalie du processus angiogénique. Les hémorragies GI sur angiodyplasies compliquent plus volontiers la MW de type 3 (dans lesquelles le déficit en VWF est par définition complet : compartiments endothélial, plasmatique et plaquettaire), et les formes constitutionnelles ou acquises associées à un déficit en VWF-HPM (MW type 2). Ce dernier point suggère que le VWF plasmatique, notamment les VWF-HPM, pourrait également jouer un rôle essentiel dans la régulation négative de l'angiogénèse, selon un mécanisme qui reste à définir<sup>23</sup>.

#### **4.3. Rôles du VWF dans la prolifération cellulaire et l'apoptose**

De façon inattendue, le VWF a récemment été impliqué dans l'induction de mécanismes pro-apoptotiques. L'interaction VWF-GpIb $\alpha$  pourrait dans certaines conditions induire l'apoptose plaquettaire<sup>34</sup>. L'interaction VWF-intégrine  $\alpha\beta3$  aurait un effet anti-prolifératif sur certaines lignées tumorales en entraînant l'apoptose des cellules cancéreuses<sup>35</sup>. Inversement, certaines tumeurs pourraient développer un mécanisme d'échappement à cet effet anti-tumoral du VWF, via la synthèse d'une protéase capable de cliver les multimères de VWF<sup>36</sup>. Le lien récent établi entre le VWF et l'artériopathie cérébrale CADASIL (cerebral autosomal

dominant arteriopathy with subcordial infarcts and leukoencephalopathy) soulève de nouvelles interrogations sur l'implication du VWF dans le remodelage de la paroi vasculaire. En cas de dépôts importants de VWF dans l'intima, l'interaction entre VWF et cellules musculaires lisses se traduirait par une modification délétère du phénotype de ces cellules, en lien avec l'induction de voies de signalisation intra-cellulaires spécifiques<sup>37</sup>.

## **Conclusions**

La récente mise en évidence de rôles multiples du VWF en dehors de l'hémostase ainsi que l'hétérogénéité clinique et biologique observée dans la MW témoignent de la physiopathologie complexe de cette protéine. Le bilan de dépistage de la MW repose sur la réalisation simultanée des dosages de FVIII, VWF:Ag, VWF:RCo et RIPA, considérant le manque de sensibilité de chacun de ces tests pris isolément. Les nouveaux tests évaluant la liaison VWF-GpIb $\alpha$  constituent un véritable progrès sur le plan diagnostique et analytique. Ils constituent une alternative au VWF:RCo, bien que ce dernier demeure encore le test fonctionnel de référence. L'interprétation des résultats nécessite une confrontation des données cliniques, de l'enquête familiale et du bilan biologique de dépistage. Ce dernier point est crucial pour le diagnostic des formes modérées de MW de type 1. Ces difficultés diagnostiques et la complexité du typage justifient en pratique un avis spécialisé.

**Remerciements** : l'auteur remercie le Dr Caron ainsi que les Pr Goudemand et Susen pour leur relecture critique de cet article

**Conflit d'intérêt** : aucun

## Références

- [1] Zhou YF, Eng ET, Zhu J, et al. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood* 2012; 120(2):449-458.
- [2] Crawley JT, de Groot R, Xiang Y, et al. Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2011; 118(12):3212-3221.
- [3] Casari C, Lenting PJ, Wohner N, et al. Clearance of von Willebrand factor. *J Thromb Haemost* 2013, 11 Suppl 1:202-211.
- [4] Souto JC, Almasy L, Soria JM, et al. Genome-wide linkage analysis of von Willebrand factor plasma levels: results from the GAIT project. *Thromb Haemost* 2003; 89(3):468-474.
- [5] Nurden P, Debili N, Vainchenker W, et al. Impaired megakaryocytopoiesis in type 2B von Willebrand disease with severe thrombocytopenia. *Blood* 2006; 108(8):2587-2595.
- [6] Poirault-Chassac S, Nguyen KA, Pietrzyk A, et al. Terminal platelet production is regulated by von Willebrand factor. *PLoS One* 2013; 8(5):e63810.
- [7] Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* 2006; 4(10):2103-2114.
- [8] Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood*; 1987; 69(2):454-9.
- [9] Nichols WL, Hultin MB, James AH, et al. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008; 14(2):171-232.
- [10] James PD, Paterson AD, Notley C, et al. Genetic linkage and association analysis in type 1 von Willebrand disease: results from the Canadian type 1 VWD study. *J Thromb Haemost* 2006; 4(4):783-792.
- [11] Casari C, Du V, Wu YP, et al. Accelerated uptake of VWF/platelet complexes in macrophages contributes to VWD type 2B-associated thrombocytopenia. *Blood* 2013; 122(16):2893-2902.
- [12] Jacobi PM, Gill JC, Flood VH, et al. Intersection of mechanisms of type 2A VWD through defects in VWF multimerization, secretion, ADAMTS-13 susceptibility, and regulated storage. *Blood* 2012; 119(19):4543-4553.
- [13] Federici AB, Mannucci PM, Castaman G, et al. Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients. *Blood* 2009; 113(3):526-534.
- [14] Legendre P, Navarrete AM, Rayes J, Casari C, Boisseau P, Ternisien C, Caron C, Fressinaud E, Goudemand J, Veyradier A et al: Mutations in the A3 domain of von Willebrand factor inducing combined qualitative and quantitative defects in the protein. *Blood* 2013; 121(11):2135-2143.
- [15] Casari C, Berrou E, Lebret M, et al. von Willebrand factor mutation promotes thrombocytopenia by inhibiting integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *J Clin Invest* 2013; 123(12):5071-5081.
- [16] Tassetto A, Rodeghiero F, Castaman G, et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost* 2006; 4(4):766-773.
- [17] Flood VH, Gill JC, Morateck PA, et al. Common VWF exon 28 polymorphisms in African Americans affecting the VWF activity assay by ristocetin cofactor. *Blood* 2010; 116(2):280-286.

- [18] Trossaert M, Ternisien C, Lefrancois A, et al. Evaluation of an automated von Willebrand factor activity assay in von Willebrand disease. *Clin Appl Thromb Hemost* 2011; 17(6):E25-29.
- [19] Lawrie AS, Stufano F, Canciani MT, et al. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia* 2013; 19(2):338-342.
- [20].Sadler JE, Rodeghiero F: Provisional criteria for the diagnosis of VWD type 1. *J Thromb Haemost* 2005; 3(4):775-777.
- [21] Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F: Evidence-based diagnosis of type 1 von Willebrand disease: a Bayes theorem approach. *Blood* 2008; 111(8):3998-4003.
- [22] Tiede A: Diagnosis and treatment of acquired von Willebrand syndrome. *Thromb Res* 2012; 130 Suppl 2:S2-6.
- [23] Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, et al. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost* 2012; 10(12):2428-2437.
- [24] Bernardo A, Ball C, Nolasco L, et al. Platelets adhered to endothelial cell-bound ultra-large von Willebrand factor strings support leukocyte tethering and rolling under high shear stress. *J Thromb Haemost* 2005; 3(3):562-570.
- [25] Petri B, Broermann A, Li H, et al. von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. *Blood* 2010; 116(22):4712-4719.
- [26] Hillgruber C, Steingraber AK, Poppelmann B, et al. Blocking von Willebrand factor for treatment of cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 2014; 134(1):77-86.
- [27].Schulz C, Engelmann B, Massberg S: Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* 2013; 11 Suppl 1:233-241.
- [28] Engelmann B, Massberg S: Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(1):34-45.
- [29] Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* 2011; 117(4):1400-1407.
- [30] Nieswandt B, Kleinschnitz C, Stoll G: Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease? *J Physiol* 2011; 589(Pt 17):4115-4123.
- [31] Kleinschnitz C, De Meyer SF, Schwarz T, et al. Deficiency of von Willebrand factor protects mice from ischemic stroke. *Blood* 2009; 113(15):3600-3603.
- [32] Zhao BQ, Chauhan AK, Canault M, et al. von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke. *Blood* 2009; 114(15):3329-3334.
- [33] Starke RD, Ferraro F, Paschalaki KE, et al. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood* 2011; 117(3):1071-1080.
- [34] Li S, Wang Z, Liao Y, et al. The glycoprotein I $\alpha$ -von Willebrand factor interaction induces platelet apoptosis. *J Thromb Haemost* 2010; 8(2):341-350.
- [35].Terraube V, Pendu R, Baruch D, et al. Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice. *J Thromb Haemost* 2006; 4(3):519-526.
- [36] Mochizuki S, Soejima K, Shimoda M, et al. Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104(12):906-922.
- [37] Zhang X, Meng H, Blaivas M, et al. Von Willebrand Factor permeates small vessels in CADASIL and inhibits smooth muscle gene expression. *Transl Stroke Res* 2012, 3(1):138-145.

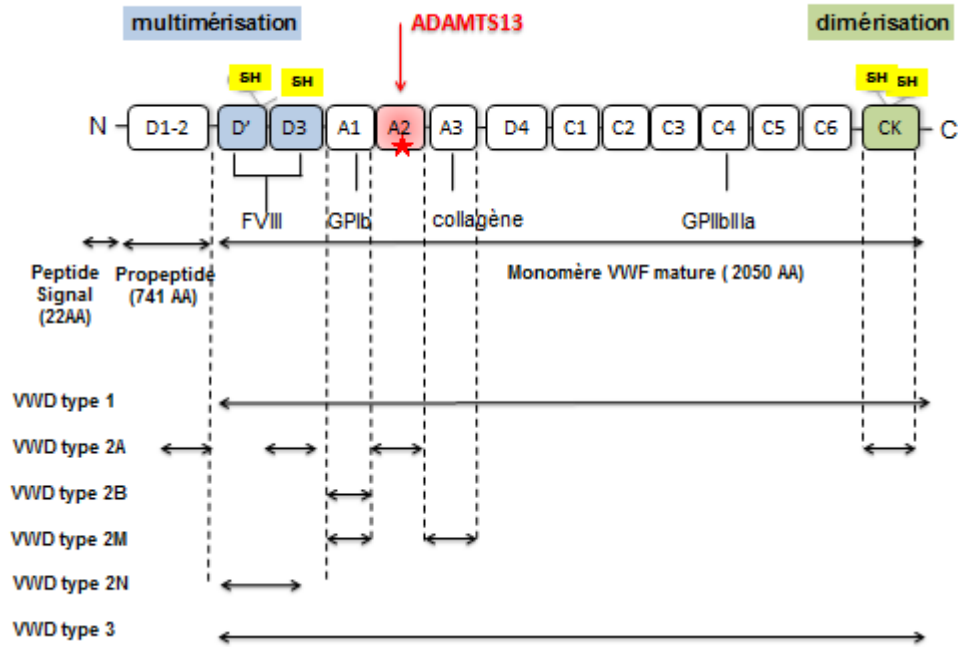
## **Légendes**

**Figure 1** : structure primaire du pré-pro-VWF (précurseur monomérique). Localisation des sites fonctionnels d'interaction du VWF [avec le FVIII (domaines D'D3), la GPIb $\alpha$  (domaine A1), le collagène sous-endothélial (domaine A3), la GPIIb/IIIa (domaine C4)] et du site de protéolyse (Y1605-M1606) par l'ADAMTS13 (domaine A2). Localisation des mutations selon le type de VWD.

**Figure 2** : modifications post-traductionnelles dans la cellule endothéliale : du pré-pro-VWF aux multimères de VWF

**Figure 3** : Organisation du dépistage et du typage de la VWD constitutionnelle

**Figure 1**



**Figure 2**

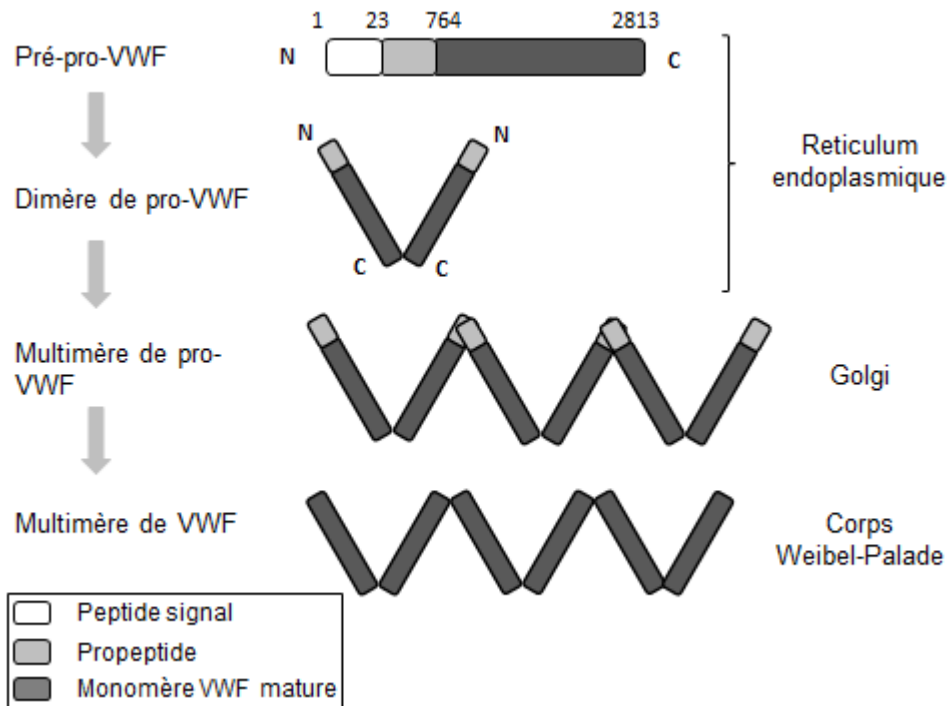
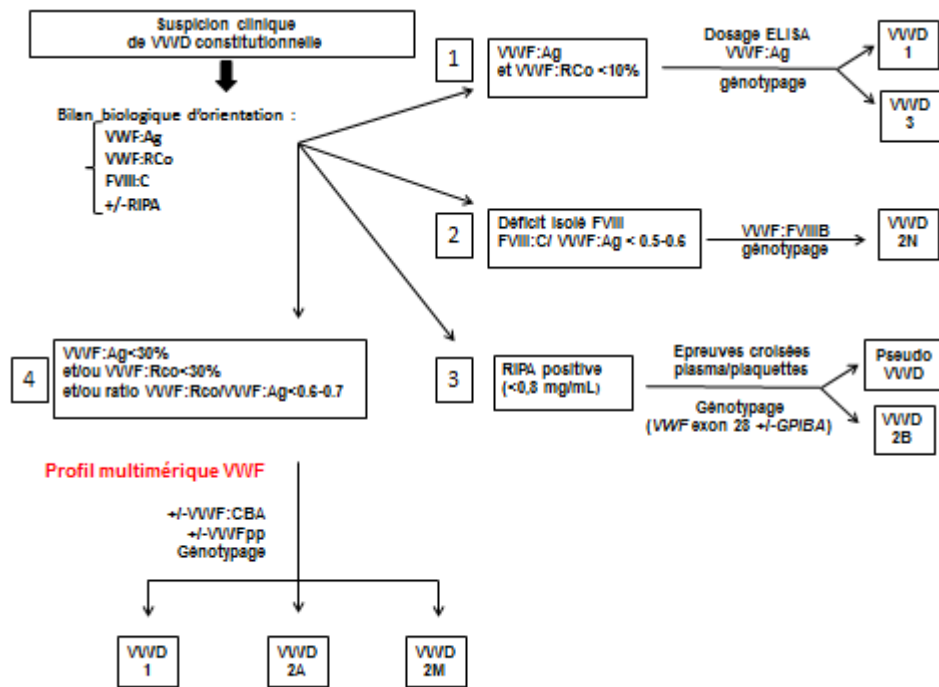




Figure 3



## Tables

<b>Tableau I – Tableau des abréviations</b>	
Aa	Acides aminés
GpIb $\alpha$	Glycoprotéine Ib $\alpha$
GpIIb/IIIa	Glycoprotéine IIb/IIIa
Da	Daltons
ADAMTS13	A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin domains-13
Y1605	Résidu Tyrosine (position 1605)
M1606	Résidu Méthionine (position 1606)
VWF-THPM	Multimères de très haut poids moléculaire
VWF-HPM	Multimères de haut poids moléculaire
VWF-IPM	Multimères de poids moléculaire intermédiaire
FVIII	Facteur VIII coagulant
PFA-100:	Platelet Function Analyser 100
PPP	Plasma pauvre en plaquettes
PRP	Plasma riche en plaquettes
TCA	Temps de céphaline activée
OMS	Organisation mondiale de la santé
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
ELFA	Enzyme-linked fluorescent assay
LIA	Latex immunoassay
IL	Immunochimiluminescence
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
Siglec-5	Sialic acid-binding Immunoglobulin-like lectin 5
TVP	Thrombose veineuse profonde
NET	Neutrophil extracellular trap
I/R	Ischémie-reperfusion
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
siRNA	Silent inhibiting RNA
CADASIL	cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcordial infarcts and leukoencephalopathy

<b>Tableau II- Nomenclature SSC-ISTH</b> (Comité Scientifique et de Standardisation de la Société Internationale de Thrombose et Hémostase)	
VWF	Facteur von Willebrand
VWD	von Willebrand disease ; Maladie de Willebrand (MW)
aVWS	Syndrome de Willebrand acquis
VWF:Ag	Antigène Facteur Willebrand
VWF:RCo	Activité cofacteur de la ristocétine du VWF
FVIII:C	Dosage chromométrique du facteur VIII
RIPA	Agrégation plaquettaire en présence de ristocétine (Ristocetin induced platelet aggregation)
VWF:FVIII B	Capacité de liaison du VWF au facteur VIII
VWF:CB	Capacité de liaison du VWF au collagène
VWFpp	Propeptide du VWF

<b>Tableau III - classification SSC-ISTH de la maladie de Willebrand</b>			
Type	Sous-type	Mode transmission	Mécanisme
Type 1		dominante*	Déficit quantitatif partiel en VWF (anomalies sécrétion, protéolyse ou clairance)
Type 2	2A	dominante (rares formes récessives)	Diminution de la proportion des formes de plus haut poids moléculaire résultant en un défaut interaction VWF-plaquettes
	2B	dominante	Gain interaction VWF-plaquettes
	2M	dominante	Défaut interaction VWF-plaquettes et/ou défaut interaction VWF-collagène non lié à un défaut des formes moléculaires les plus lourdes
	2N	récessive	Défaut interaction VWF-FVIII
Type 3		récessive	Déficit quantitatif total en VWF
* pénétrance intra-familiale variable			

<b>Tableau IV – Méthodes de dosage du VWF:Ag*</b>				
	<b>ELISA</b>	<b>ELFA</b>	<b>LIA</b>	<b>IL</b>
<b>Réactifs</b> (anticorps anti-VWF)	<b>Fragments F(ab')<sub>2</sub></b>	<b>Ac monoclonaux</b>	<b>Ac polyclonaux</b>	<b>Ac monoclonaux</b>
<b>Limite quantification</b>	< 1 UI.dL <sup>-1</sup>	1 à 5 UI.dL <sup>-1</sup>	< 6 UI.dL <sup>-1</sup>	< 1 UI.dL <sup>-1</sup>
<b>CV inter-laboratoire</b>	13 à 19%	nd	9 à 15%	nd
<b>Interférence FR**</b>	non	non	oui	Non
<b>Automatisation</b>	non	oui	oui	Oui
*pré-analytique (cf recommandations GEHT 2007)				
**FR : facteur rhumatoïde				
nd : non évalué				

**Tableau V – Méthodes de dosage de l'activité VWF\***

	VWF:RCo					VWF:Act	
	Sur lame	Sur agrégomètre	Sur automate	LIA	Chimi-luminescence HemosIL Acustar VWF:RCo IL	LIA HemosIL VWF Activity, IL	LIA Innovance VWF Ac, Siemens
Réactifs	Plaquettes fixées			rGplba	Ac monoclonaux	Ac monoclonaux	rGPIba
Sensibilité	2 UI/dl	10 UI/dl	3 à 10 UI/dl	3,5 UI/dl	< 1 UI/dl	6-8 U/dl	< 4 U/dl
CV interséries		15 à 20 %	<15%	<5%	<10%	<10%	<5% <i>(données fabricant)</i>
Dosage unitaire	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
Distinction VWD 1 & 3	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui
VWD 1 & 2	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non (certains variants)	Oui

\* Pré-analytique (cf recommandations GEHT 2007)

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL: **Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1974, **71**(5):1906-1909.
2. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, Wagner DD: **Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes.** *J Clin Invest* 1985, **76**(3):1102-1106.
3. Legaz ME, Schmer G, Counts RB, Davie EW: **Isolation and characterization of human Factor VIII (antihemophilic factor).** *The Journal of biological chemistry* 1973, **248**(11):3946-3955.
4. Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GA, Latt SA, Orkin SH: **Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization.** *Science* 1985, **228**(4706):1401-1406.
5. Lynch DC, Zimmerman TS, Collins CJ, Brown M, Morin MJ, Ling EH, Livingston DM: **Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: authentication by a new method.** *Cell* 1985, **41**(1):49-56.
6. Sadler JE, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Harlan JM, Titani K, Davie EW: **Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**(19):6394-6398.
7. Verweij CL, de Vries CJ, Distel B, van Zonneveld AJ, van Kessel AG, van Mourik JA, Pannekoek H: **Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene.** *Nucleic Acids Res* 1985, **13**(13):4699-4717.
8. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester-Mancuso TL, Le Beau MM, Sorace JM, Sadler JE: **Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction.** *Biochemistry* 1991, **30**(1):253-269.
9. Shelton-Inloes BB, Titani K, Sadler JE: **cDNA sequences for human von Willebrand factor reveal five types of repeated domains and five possible protein sequence polymorphisms.** *Biochemistry* 1986, **25**(11):3164-3171.
10. Zhou YF, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA: **Sequence and structure relationships within von Willebrand factor.** *Blood* 2012, **120**(2):449-458.
11. Katsumi A, Tuley EA, Bodo I, Sadler JE: **Localization of disulfide bonds in the cystine knot domain of human von Willebrand factor.** *J Biol Chem* 2000, **275**(33):25585-25594.
12. Wagner DD, Lawrence SO, Ohlsson-Wilhelm BM, Fay PJ, Marder VJ: **Topology and order of formation of interchain disulfide bonds in von Willebrand factor.** *Blood* 1987, **69**(1):27-32.
13. Purvis AR, Sadler JE: **A covalent oxidoreductase intermediate in propeptide-dependent von Willebrand factor multimerization.** *J Biol Chem* 2004, **279**(48):49982-49988.
14. Springer TA: **Biology and physics of von Willebrand factor concatamers.** *J Thromb Haemost* 2011, **9 Suppl 1**:130-143.
15. Zhou YF, Eng ET, Nishida N, Lu C, Walz T, Springer TA: **A pH-regulated dimeric bouquet in the structure of von Willebrand factor.** *Embo J* 2011, **30**(19):4098-4111.
16. Springer TA: **von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream.** *Blood* 2014, **124**(9):1412-1425.
17. Titani K, Kumar S, Takio K, Ericsson LH, Wade RD, Ashida K, Walsh KA, Chopek MW, Sadler JE, Fujikawa K: **Amino acid sequence of human von Willebrand factor.** *Biochemistry* 1986, **25**(11):3171-3184.
18. Marti T, Rosselet SJ, Titani K, Walsh KA: **Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor.** *Biochemistry* 1987, **26**(25):8099-8109.

19. McGrath RT, van den Biggelaar M, Byrne B, O'Sullivan JM, Rawley O, O'Kennedy R, Voorberg J, Preston RJ, O'Donnell JS: **Altered glycosylation of platelet-derived von Willebrand factor confers resistance to ADAMTS13 proteolysis.** *Blood* 2013, **122**(25):4107-10.
20. Galbusera M, Zoja C, Donadelli R, Paris S, Morigi M, Benigni A, Figliuzzi M, Remuzzi G, Remuzzi A: **Fluid shear stress modulates von Willebrand factor release from human vascular endothelium.** *Blood* 1997, **90**(4):1558-1564.
21. Mannucci PM, Cattaneo M: **Desmopressin: a nontransfusal treatment of hemophilia and von Willebrand disease.** *Haemostasis* 1992, **22**(5):276-280.
22. Casari C, Lenting PJ, Wohner N, Christophe OD, Denis CV: **Clearance of von Willebrand factor.** *J Thromb Haemost* 2013, **11 Suppl 1**:202-211.
23. Badirou I, Kurdi M, Rayes J, Legendre P, Christophe OD, Lenting PJ, Denis CV: **von Willebrand factor clearance does not involve proteolysis by ADAMTS-13.** *J Thromb Haemost* 2010, **8**(10):2338-2340.
24. Grewal PK, Uchiyama S, Ditto D, Varki N, Le DT, Nizet V, Marth JD: **The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis.** *Nat. Med.* 2008, **14**(6):648-655.
25. Pegon JN, Kurdi M, Casari C, Odouard S, Denis CV, Christophe OD, Lenting PJ: **Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5.** *Haematologica* 2012, **97**(12):1855-63.
26. Rydz N, Swystun LL, Notley C, Paterson AD, Riches JJ, Sponagle K, Boonyawat B, Montgomery RR, James PD, Lillicrap D: **The C-type lectin receptor CLEC4M binds, internalizes, and clears von Willebrand factor and contributes to the variation in plasma von Willebrand factor levels.** *Blood* 2013, **121**(26):5228-37.
27. Rastegarlarlari G, Pegon JN, Casari C, Odouard S, Navarrete AM, Saint-Lu N, van Vlijmen BJ, Legendre P, Christophe OD, Denis CV, Lenting PJ: **Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor.** *Blood* 2012, **119**(9):2126-34.
28. Ruggeri ZM, Ware J.: **von Willebrand factor.** *FASEB J.* 1993, **7**(2):308-16.
29. Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, Gorzelanny C, Alexander-Katz A, Netz RR, Schneider MF: **Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(19):7899-903.
30. Jackson SP: **The growing complexity of platelet aggregation.** *Blood* 2007, **109**(12):5087-5095.
31. Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, Denis CV: **von Willebrand factor: the old, the new and the unknown.** *J Thromb Haemost* 2012, **10**(12):2428-2437.
32. Foster PA, Fulcher CA, Marti T, Titani K, Zimmerman TS: **A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor.** *J Biol Chem* 1987, **262**(18):8443-8446.
33. Takahashi Y, Kalafatis M, Girma JP, Sewerin K, Andersson LO, Meyer D: **Localization of a factor VIII binding domain on a 34 kilodalton fragment of the N-terminal portion of von Willebrand factor.** *Blood* 1987, **70**(5):1679-1682.
34. Koedam JA, Meijers JC, Sixma JJ, Bouma BN: **Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor.** *J Clin Invest* 1988, **82**(4):1236-1243.
35. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Choi H, Moake JL, Dong JF: **Platelets adhered to endothelial cell-bound ultra-large von Willebrand factor strings support leukocyte tethering and rolling under high shear stress.** *J Thromb Haemost* 2005, **3**(3):562-570.
36. Petri B, Broermann A, Li H, Khandoga AG, Zarbock A, Krombach F, Goerge T, Schneider SW, Jones C, Nieswandt B *et al*: **von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation.** *Blood* 2010, **116**(22):4712-4719.



37. Grässle S, Huck V, Pappelbaum KI, Gorzelanny C, Aponte-Santamaría C, Baldauf C, Gräter F, Schneppenheim R, Obser T, Schneider SW: **von Willebrand factor directly interacts with DNA from neutrophil extracellular traps.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014, **34**(7):1382-9.
38. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: **Neutrophil extracellular traps kill bacteria.** *Science* 2004, **303**(5663):1532-5.
39. Martinod K, Wagner DD: **Thrombosis: tangled up in NETs.** *Bloo.* 2014, **123**(18):2768-76.
40. Hillgruber C, Steingraber AK, Poppelmann B, Denis CV, Ware J, Vestweber D, Nieswandt B, Schneider SW, Goerge T: **Blocking von Willebrand factor for treatment of cutaneous inflammation.** *J Invest Dermatol* 2014, **134**(1):77-86.
41. Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, Yang JJ, De Meyer SF, Kollnberger M, Wakefield TW, Lammle B, Massberg S, Wagner DD: **von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models.** *Blood* 2011, **117**(4):1400-1407.
42. Nieswandt B, Kleinschnitz C, Stoll G: **Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease?** *J Physiol* 2011, **589**(Pt 17):4115-4123.
43. Kleinschnitz C, De Meyer SF, Schwarz T, Austinat M, Vanhoorelbeke K, Nieswandt B, Deckmyn H, Stoll G: **Deficiency of von Willebrand factor protects mice from ischemic stroke.** *Blood* 2009, **113**(15):3600-3603.
44. Zhao BQ, Chauhan AK, Canault M, Patten IS, Yang JJ, Dockal M, Scheiflinger F, Wagner DD: **von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke.** *Blood* 2009, **114**(15):3329-3334.
45. Starke RD, Ferraro F, Paschalaki KE, Dryden NH, McKinnon TA, Sutton RE, Payne EM, Haskard DO, Hughes AD, Cutler DF *et al*: **Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis.** *Blood* 2011, **117**(3):1071-1080.
46. Starke RD, Paschalaki KE, Dyer CE, Harrison-Lavoie KJ, Cutler JA, McKinnon TA, Millar CM, Cutler DF, Laffan MA, Randi AM: **Cellular and molecular basis of von Willebrand disease: studies on blood outgrowth endothelial cells.** *Blood* 2013, **121**(14):2773-2784.
47. Randi AM, Laffan MA, Starke RD: **Von Willebrand factor, angiodysplasia and angiogenesis.** *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013, **5**(1):e2013060.
48. Li S, Wang Z, Liao Y, Zhang W, Shi Q, Yan R, Ruan C, Dai K: **The glycoprotein Ibalphavon Willebrand factor interaction induces platelet apoptosis.** *J Thromb Haemost* 2010, **8**(2):341-350.
49. Terraube V, Pendu R, Baruch D, Gebbink MF, Meyer D, Lenting PJ, Denis CV: **Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice.** *J Thromb Haemost* 2006, **4**(3):519-526.
50. Mochizuki S1, Soejima K, Shimoda M, Abe H, Sasaki A, Okano HJ, Okano H, Okada Y: **Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor.** *J Natl Cancer Inst* 2012, **104**(12):906-922.
51. Zhang X, Meng H, Blaivas M, Rushing EJ, Moore BE, Schwartz J, Lopes MB, Worrall BB, Wang MM: **Von Willebrand Factor permeates small vessels in CADASIL and inhibits smooth muscle gene expression.** *Transl Stroke Res* 2012, **3**(1):138-145.
52. Nurden P, Debili N, Vainchenker W, Bobe R, Bredoux R, Corvazier E, Combrie R, Fressinaud E, Meyer D, Nurden AT, Enouf J: **Impaired megakaryocytopoiesis in type 2B von Willebrand disease with severe thrombocytopenia.** *Blood* 2006, **108**(8):2587-2595.
53. Poirault-Chassac S1, Nguyen KA, Pietrzyk A, Casari C, Veyradier A, Denis CV, Baruch D: **Terminal platelet production is regulated by von Willebrand factor.** *PLoS One* 2013; **8**(5):e63810.
54. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, Yang AY, Siemieniak DR, Stark KR, Gruppo R *et al*: **Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura.** *Nature* 2001, **413**(6855):488-494.

55. Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Ishikawa M, Iwamoto TA, Mori T, Wanaka A, Fukui H *et al*: **Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver.** *Blood* 2005, **106**(3):922-924.
56. Turner N, Nolasco L, Tao Z, Dong JF, Moake J: **Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13.** *J Thromb Haemost* 2006, **4**(6):1396-1404.
57. Furlan M, Robles R, Lammle 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**(10):4223-4234.
58. Tsai HM: **Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion.** *Blood* 1996, **87**(10):4235-4244.
59. Crawley JT, de Groot R, Xiang Y, Luken BM, Lane DA: **Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor.** *Blood* 2011, **118**(12):3212-3221.
60. Gao W, Anderson PJ, Majerus EM, Tuley EA, Sadler JE: **Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(50):19099-19104.
61. Zanardelli S, Chion AC, Groot E, Lenting PJ, McKinnon TA, Laffan MA, Tseng M, Lane DA: **A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF.** *Blood* 2009, **114**(13):2819-2828.
62. Feys HB, Anderson PJ, Vanhoorelbeke K, Majerus EM, Sadler JE: **Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor.** *J Thromb Haemost* 2009, **7**(12):2088-2095. *Blood* 2009, **114**(13):2819-2828.
63. Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, Wong WP, Springer TA: **Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor.** *Science* 2009, **324**(5932):1330-4.
64. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favalaro EJ, Hill FG, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci PM *et al*: **Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor.** *J Thromb Haemost* 2006, **4**(10):2103-2114.
65. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E: **Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease.** *Blood* 1987, **69**(2):454-459.
66. Werner EJ, Broxson EH, Tucker EL, Giroux DS, Shults J, Abshire TC: **Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study.** *J Pediatr* 1993, **123**(6):893-898.
67. Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL, Rick ME, Sadler JE, Weinstein M, Yawn BP: **von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA).** *Haemophilia* 2008, **14**(2):171-232.
68. James PD, Paterson AD, Notley C, Cameron C, Hegadorn C, Tinlin S, Brown C, O'Brien L, Leggo J, Lillicrap D: **Genetic linkage and association analysis in type 1 von Willebrand disease: results from the Canadian type 1 VWD study.** *J Thromb Haemost* 2006, **4**(4):783-792.
69. James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S, Brown C, Andrews C, Labelle A, Chirinian Y *et al*: **The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study.** *Blood* 2007, **109**(1):145-154.
70. Ruggeri ZM, Zimmerman TS: **The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor.** *Blood* 1981, **57**(6):1140-1143.
71. Furlan M, Robles R, Affolter D, Meyer D, Baillod P, Lammle B: **Triplet structure of von Willebrand factor reflects proteolytic degradation of high molecular weight multimers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**(16):7503-7507.
72. Zimmerman TS, Dent JA, Ruggeri ZM, Nannini LH: **Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID, and IIE).** *J Clin Invest* 1986, **77**(3):947-951.

73. Lyons SE, Bruck ME, Bowie EJ, Ginsburg D: **Impaired intracellular transport produced by a subset of type IIA von Willebrand disease mutations.** *J Biol Chem* 1992, **267**(7):4424-4430.
74. Shim K, Anderson PJ, Tuley EA, Wiswall E, Sadler JE: **Platelet-VWF complexes are preferred substrates of ADAMTS13 under fluid shear stress.** *Blood* 2008, **111**(2):651-657.
75. Nishio K, Anderson PJ, Zheng XL, Sadler JE: **Binding of platelet glycoprotein Ibalpha to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(29):10578-10583.
76. Casari C, Berrou E, Lebret M, et al. **von Willebrand factor mutation promotes thrombocytopeny by inhibiting integrin alphaIIb beta3.** *J Clin Invest* 2013; **123**(12):5071-5081.
77. Federici AB, Mannucci PM, Castaman G, et al. **Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients.** *Blood* 2009; **113**(3):526-534.
78. Goudemand J, Samor B, Caron C, Jude B, Gosset D, Mazurier C: **Acquired type II von Willebrand's disease: demonstration of a complexed inhibitor of the von Willebrand factor-platelet interaction and response to treatment.** *Br J Haematol* 1988, **68**(2):227-233.
79. Mannucci PM, Lombardi R, Bader R, Horellou MH, Finazzi G, Besana C, Conard J, Samama M: **Studies of the pathophysiology of acquired von Willebrand's disease in seven patients with lymphoproliferative disorders or benign monoclonal gammopathies.** *Blood* 1984, **64**(3):614-621.
80. Budde U, Scharf RE, Franke P, Hartmann-Budde K, Dent J, Ruggeri ZM: **Elevated platelet count as a cause of abnormal von Willebrand factor multimer distribution in plasma.** *Blood* 1993, **82**(6):1749-1757.
81. Facon T, Caron C, Courtin P, Wurtz A, Deghaye M, Bauters F, Mazurier C, Goudemand J: **Acquired type II von Willebrand's disease associated with adrenal cortical carcinoma.** *Br J Haematol* 1992, **80**(4):488-494.
82. Budde U, Dent JA, Berkowitz SD, Ruggeri ZM, Zimmerman TS: **Subunit composition of plasma von Willebrand factor in patients with the myeloproliferative syndrome.** *Blood* 1986, **68**(6):1213-7.
83. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, Six I, Fabre O, Juthier F, Bauters A, Decoene C, Goudemand J, Prat A et al: **Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis.** *N Engl J Med* 2003, **349**(4):343-349.
84. Uriel N, Pak SW, Jorde UP, Jude B, Susen S, Vincentelli A, Ennezat PV, Cappelman S, Naka Y, Mancini D: **Acquired von Willebrand syndrome after continuous-flow mechanical device support contributes to a high prevalence of bleeding during long-term support and at the time of transplantation.** *J Am Coll Cardiol* 2010, **56**(15):1207-1213.
85. Federici AB, Rand JH, Bucciarelli P, Budde U, van Genderen PJ, Mohri H, Meyer D, Rodeghiero F, Sadler JE: **Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry.** *Thromb Haemost* 2000, **84**(2):345-349.
86. Tiede A, Priesack J, Werwitzke S, Bohlmann K, Oortwijn B, Lenting P, Eisert R, Ganser A, Budde U: **Diagnostic workup of patients with acquired von Willebrand syndrome: a retrospective single-centre cohort study.** *J Thromb Haemost* 2008, **6**(4):569-576.
87. Tiede A, Rand JH, Budde U, Ganser A, Federici AB: **How I treat the acquired von Willebrand syndrome.** *Blood* 2011, **117**(25):6777-6785.
88. Fressinaud E, Meyer D: **International survey of patients with von Willebrand disease and angiodysplasia.** *Thromb Haemost* 1993, **70**(3):546.
89. Jackson CS, Gerson LB: **Management of gastrointestinal angiodysplastic lesions (GIADs): a systematic review and meta-analysis.** *Am J Gastroenterol* 2014, **109**(4):474-483; quiz 484.

90. Castaman G, Federici AB, Tosetto A, La Marca S, Stufano F, Mannucci PM, Rodeghiero F: **Different bleeding risk in type 2A and 2M von Willebrand disease: a 2-year prospective study in 107 patients.** *J Thromb Haemost* 2012, **10**(4):632-638.
91. Blackshear JL, Wysokinska EM, Safford RE, Thomas CS, Shapiro BP, Ung S, Stark ME, Parikh P, Johns GS, Chen D: **Shear stress-associated acquired von Willebrand syndrome in patients with mitral regurgitation.** *J Thromb Haemost* 2014.
92. Islam S, Cevik C, Madonna R, Frandah W, Islam E, Nugent K: **Left ventricular assist devices and gastrointestinal bleeding: a narrative review of case reports and case series.** *Clin Cardiol* 2013, **36**(4):190-200.
93. Meyer AL, Malehsa D, Bara C, Budde U, Slaughter MS, Haverich A, Strueber M: **Acquired von Willebrand syndrome in patients with an axial flow left ventricular assist device.** *Circ Heart Fail*, **3**(6):675-681.
94. Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, et al. **Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases.** *Blood* 1998;91:1325-31.
95. Berntorp E: **Prophylaxis and treatment of bleeding complications in von Willebrand disease type 3.** *Semin Thromb Hemost* 2006, **32**(6):621-625.
96. Federici AB: **Prophylaxis of bleeding episodes in patients with von Willebrand's disease.** *Blood Transfus* 2008, **6 Suppl 2**:s26-32.
97. Halimeh S, Krumpel A, Rott H, Bogdanova N, Budde U, Manner D, Faeser B, Mesters R, Nowak-Gottl U: **Long-term secondary prophylaxis in children, adolescents and young adults with von Willebrand disease. Results of a cohort study.** *Thromb Haemost* 2011, **105**(4):597-604.
98. Osnabrugge RL, Mylotte D, Head SJ, Van Mieghem NM, Nkomo VT, LeReun CM, Bogers AJ, Piazza N, Kappetein AP: **Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study.** *J Am Coll Cardiol* 2013, **62**(11):1002-1012.
99. Godino C, Lauretta L, Pavon AG, Mangieri A, Viani G, Chieffo A, Galaverna S, Latib A, Montorfano M, Cappelletti A *et al*: **Heyde's syndrome incidence and outcome in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation.** *J Am Coll Cardiol* 2013, **61**(6):687-689.
100. Cappell MS, Lebowitz O: **Cessation of recurrent bleeding from gastrointestinal angiodysplasias after aortic valve replacement.** *Ann Intern Med* 1986, **105**(1):54-57.
101. King RM, Pluth JR, Giuliani ER: **The association of unexplained gastrointestinal bleeding with calcific aortic stenosis.** *Ann Thorac Surg* 1987, **44**(5):514-516.
102. Warkentin TE, Moore JC, Morgan DG: **Aortic stenosis and bleeding gastrointestinal angiodysplasia: is acquired von Willebrand's disease the link?** *Lancet* 1992, **340**(8810):35-37.
103. Veyradier A, Balian A, Wolf M, Giraud V, Montembault S, Obert B, Dagher I, Chaput JC, Meyer D, Naveau S: **Abnormal von Willebrand factor in bleeding angiodysplasias of the digestive tract.** *Gastroenterology* 2001, **120**(2):346-353.
104. Anderson RP, McGrath K, Street A: **Reversal of aortic stenosis, bleeding gastrointestinal angiodysplasia, and von Willebrand syndrome by aortic valve replacement.** *Lancet* 1996, **347**(9002):689-690.
105. Pareti FI, Lattuada A, Bressi C, Zanobini M, Sala A, Steffan A, Ruggeri ZM: **Proteolysis of von Willebrand factor and shear stress-induced platelet aggregation in patients with aortic valve stenosis.** *Circulation* 2000, **102**(11):1290-1295.
106. Le Tourneau T, Susen S, Caron C, Millaire A, Marechaux S, Polge AS, Vincentelli A, Mouquet F, Ennezat PV, Lamblin N *et al*: **Functional impairment of von Willebrand factor in hypertrophic cardiomyopathy: relation to rest and exercise obstruction.** *Circulation* 2008, **118**(15):1550-1557.

107. Rauch R, Budde U, Koch A, Girisch M, Hofbeck M: **Acquired von Willebrand syndrome in children with patent ductus arteriosus.** *Heart* 2002, **88**(1):87-88.
108. Gill JC, Wilson AD, Endres-Brooks J, Montgomery RR: **Loss of the largest von Willebrand factor multimers from the plasma of patients with congenital cardiac defects.** *Blood* 1986, **67**(3):758-761.
109. Waldow HC, Westhoff-Bleck M, Widera C, Templin C, von Depka M: **Acquired von Willebrand syndrome in adult patients with congenital heart disease.** *Int J Cardiol* 2014, **176**(3):739-745.
110. Miller LW, Pagani FD, Russell SD, John R, Boyle AJ, Aaronson KD, Conte JV, Naka Y, Mancini D, Delgado RM *et al*: **Use of a continuous-flow device in patients awaiting heart transplantation.** *N Engl J Med* 2007, **357**(9):885-896.
111. Slaughter MS, Rogers JG, Milano CA, Russell SD, Conte JV, Feldman D, Sun B, Tatroles AJ, Delgado RM, 3rd, Long JW *et al*: **Advanced heart failure treated with continuous-flow left ventricular assist device.** *N Engl J Med* 2009, **361**(23):2241-2251.
112. Shrode CW, Draper KV, Huang RJ, Kennedy JL, Godsey AC, Morrison CC, Shami VM, Wang AY, Kern JA, Bergin JD *et al*: **Significantly higher rates of gastrointestinal bleeding and thromboembolic events with left ventricular assist devices.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014, **12**(9):1461-1467.
113. Crow S, John R, Boyle A, Shumway S, Liao K, Colvin-Adams M, Toninato C, Missov E, Pritzker M, Martin C *et al*: **Gastrointestinal bleeding rates in recipients of nonpulsatile and pulsatile left ventricular assist devices.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009, **137**(1):208-215.
114. Pagani FD, Miller LW, Russell SD, Aaronson KD, John R, Boyle AJ, Conte JV, Bogaev RC, MacGillivray TE, Naka Y *et al*: **Extended mechanical circulatory support with a continuous-flow rotary left ventricular assist device.** *J Am Coll Cardiol* 2009, **54**(4):312-321.
115. Starling RC, Naka Y, Boyle AJ, Gonzalez-Stawinski G, John R, Jorde U, Russell SD, Conte JV, Aaronson KD, McGee EC, Jr. *et al*: **Results of the post-U.S. Food and Drug Administration-approval study with a continuous flow left ventricular assist device as a bridge to heart transplantation: a prospective study using the INTERMACS (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support).** *J Am Coll Cardiol* 2011, **57**(19):1890-1898.
116. Slaughter MS, Pagani FD, Rogers JG, Miller LW, Sun B, Russell SD, Starling RC, Chen L, Boyle AJ, Chillcott S *et al*: **Clinical management of continuous-flow left ventricular assist devices in advanced heart failure.** *J Heart Lung Transplant* 2010, **29**(4 Suppl):S1-39.
117. Hasin T, Marmor Y, Kremers W, Topilsky Y, Severson CJ, Schirger JA, Boilson BA, Clavell AL, Rodeheffer RJ, Frantz RP *et al*: **Readmissions after implantation of axial flow left ventricular assist device.** *J Am Coll Cardiol* 2013, **61**(2):153-163.
118. Bunte MC, Blackstone EH, Thuita L, Fowler J, Joseph L, Ozaki A, Starling RC, Smedira NG, Mountis MM: **Major bleeding during HeartMate II support.** *J Am Coll Cardiol* 2013, **62**(23):2188-2196.
119. Zangrillo A, Landoni G, Biondi-Zoccai G, Greco M, Greco T, Frati G, Patroniti N, Antonelli M, Pesenti A, Pappalardo F: **A meta-analysis of complications and mortality of extracorporeal membrane oxygenation.** *Crit Care* 2013, **15**(3):172-8.
120. Eckman PM, John R: **Bleeding and thrombosis in patients with continuous-flow ventricular assist devices.** *Circulation* 2012, **125**(24):3038-3047.
121. Crow S, Milano C, Joyce L, Chen D, Arepally G, Bowles D, Thomas W, Ortiz NV: **Comparative analysis of von Willebrand factor profiles in pulsatile and continuous left ventricular assist device recipients.** *Asaio J* 2010, **56**(5):441-445.
122. Malehsa D, Meyer AL, Bara C, Struber M: **Acquired von Willebrand syndrome after exchange of the HeartMate XVE to the HeartMate II ventricular assist device.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2009, **35**(6):1091-1093.

123. Klovaite J, Gustafsson F, Mortensen SA, Sander K, Nielsen LB: **Severely impaired von Willebrand factor-dependent platelet aggregation in patients with a continuous-flow left ventricular assist device (HeartMate II).** *J Am Coll Cardiol* 2009, **53**(23):2162-2167.
124. Meyer AL, Malehsa D, Budde U, Bara C, Haverich A, Strueber M: **Acquired von Willebrand syndrome in patients with a centrifugal or axial continuous flow left ventricular assist device.** *JACC Heart Fail* 2014, **2**(2):141-145.
125. Davis ME, Haglund NA, Tricarico NM, Keebler ME, Maltais S: **Development of acquired von Willebrand syndrome during short-term micro axial pump support: implications for bleeding in a patient bridged to a long-term continuous-flow left ventricular assist device.** *Asaio J* 2014, **60**(3):355-357.
126. Heilmann C, Geisen U, Beyersdorf F, Nakamura L, Benk C, Trummer G, Berchtold-Herz M, Schlensak C, Zieger B: **Acquired von Willebrand syndrome in patients with extracorporeal life support (ECLS).** *Intensive Care Med* 2012, **38**(1):62-68.
127. Pasala S, Fiser RT, Stine KC, Swearingen CJ, Proadhan P: **von Willebrand Factor Multimers in Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation Support.** *Asaio J* 2014.
128. Heilmann C, Geisen U, Beyersdorf F, Nakamura L, Trummer G, Berchtold-Herz M, Schlensak C, Zieger B: **Acquired Von Willebrand syndrome is an early-onset problem in ventricular assist device patients.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2011, **40**(6):1328-1333; discussion 1233.
129. Heilmann C, Geisen U, Beyersdorf F, Nakamura L, Benk C, Berchtold-Herz M, Trummer G, Schlensak C, Zieger B: **Acquired von Willebrand syndrome in patients with ventricular assist device or total artificial heart.** *Thromb Haemost* 2010, **103**(5):962-967.
130. Dassanayaka S, Slaughter MS, Bartoli CR: **Mechanistic pathway(s) of acquired von willebrand syndrome with a continuous-flow ventricular assist device: in vitro findings.** *Asaio J* 2013, **59**(2):123-129.
131. Bartoli CR, Dassanayaka S, Brittan KR, Luckett A, Sithu S, Siess T, Raess DH, Spence PA, Koenig SC, Dowling RD *et al*: **Insights into the mechanism(s) of von Willebrand factor degradation during mechanical circulatory support.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014, **147**(5):1634-1643.
132. Feldman D, Pamboukian SV, Teuteberg JJ, Birks E, Lietz K, Moore SA, Morgan JA, Arabia F, Bauman ME, Buchholz HW *et al*: **The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Guidelines for mechanical circulatory support: executive summary.** *J Heart Lung Transplant* 2013, **32**(2):157-187.
133. Thompson JL, 3rd, Schaff HV, Dearani JA, Park SJ, Sundt TM, 3rd, Suri RM, Blackshear JL, Daly RC: **Risk of recurrent gastrointestinal bleeding after aortic valve replacement in patients with Heyde syndrome.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012, **144**(1):112-116.
134. Blackshear JL, Schaff HV, Ommen SR, Chen D, Nichols WL: **Hypertrophic obstructive cardiomyopathy, bleeding history, and acquired von Willebrand syndrome: response to septal myectomy.** *Mayo Clin Proc* 2011, **86**(3):219-224.
135. Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, Borenstein N, Tron C, Bauer F, Derumeaux G, Anselme F, Laborde F, Leon MB: **Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description.** *Circulation* 2002, **106**(24):3006-3008.
136. Leon MB, Smith CR, Mack M, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, Tuzcu EM, Webb JG, Fontana GP, Makkar RR *et al*: **Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery.** *N Engl J Med*, **363**(17):1597-1607.
137. Kodali SK, Williams MR, Smith CR, Svensson LG, Webb JG, Makkar RR, Fontana GP, Dewey TM, Thourani VH, Pichard AD *et al*: **Two-year outcomes after transcatheter or surgical aortic-valve replacement.** *N Engl J Med*, **366**(18):1686-1695.
138. Bax JJ, Delgado V, Bapat V, Baumgartner H, Collet JP, Erbel R, Hamm C, Kappetein AP, Leipsic J, Leon MB *et al*: **Open issues in transcatheter aortic valve implantation. Part 2: procedural**

- issues and outcomes after transcatheter aortic valve implantation. *Eur Heart J* 2014, **35**(38):2639-2654.
139. Rauch A, Wohner N, Christophe OD, Denis CV, Susen S, Lenting PJ: **On the versatility of von Willebrand factor.** *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013, **5**(1):e2013046.
  140. Loscalzo J: **From clinical observation to mechanism--Heyde's syndrome.** *N Engl J Med*, **367**(20):1954-1956.
  141. Wever-Pinzon O, Selzman CH, Drakos SG, Saidi A, Stoddard GJ, Gilbert EM, Labedi M, Reid BB, Davis ES, Kfoury AG *et al*: **Pulsatility and the risk of nonsurgical bleeding in patients supported with the continuous-flow left ventricular assist device HeartMate II.** *Circ Heart Fail* 2013, **6**(3):517-526.
  142. Stulak JM, Lee D, Haft JW, Romano MA, Cowger JA, Park SJ, Aaronson KD, Pagani FD: **Gastrointestinal bleeding and subsequent risk of thromboembolic events during support with a left ventricular assist device.** *J Heart Lung Transplant* 2014, **33**(1):60-64.
  143. Coutance G, Saplaçan V, Belin A, Repesse Y, Buklas D, Massetti M: **Octreotide for recurrent intestinal bleeding due to ventricular assist device.** *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2014, **22**(3):350-352.
  144. Ray R, Kale PP, Ha R, Banerjee D: **Treatment of Left Ventricular Assist Device Associated Arteriovenous Malformations with Thalidomide.** *Asaio J* 2014.
  145. Junquera F, Saperas E, Videla S, Feu F, Vilaseca J, Armengol JR, Bordas JM, Pique JM, Malagelada JR: **Long-term efficacy of octreotide in the prevention of recurrent bleeding from gastrointestinal angiodysplasia.** *Am J Gastroenterol* 2007, **102**(2):254-260.
  146. Ge ZZ, Chen HM, Gao YJ, Liu WZ, Xu CH, Tan HH, Chen HY, Wei W, Fang JY, Xiao SD: **Efficacy of thalidomide for refractory gastrointestinal bleeding from vascular malformation.** *Gastroenterology* 2011, **141**(5):1629-1637 e1621-1624.
  147. Franchini M, Mannucci PM: **Gastrointestinal angiodysplasia and bleeding in von Willebrand disease.** *Thromb Haemost* 2014, **112**(3):427-431.
  148. Starling RC, Moazami N, Silvestry SC, Ewald G, Rogers JG, Milano CA, Rame JE, Acker MA, Blackstone EH, Ehrlinger J *et al*: **Unexpected abrupt increase in left ventricular assist device thrombosis.** *N Engl J Med* 2014, **370**(1):33-40.
  149. Thompson EA, Howard MA: **Proteolytic cleavage of human von Willebrand factor induced by enzyme(s) released from polymorphonuclear cells.** *Blood* 1986, **67**(5):1281-1285.
  150. Raife TJ, Cao W, Atkinson BS, Bedell B, Montgomery RR, Lentz SR, Johnson GF, Zheng XL: **Leukocyte proteases cleave von Willebrand factor at or near the ADAMTS13 cleavage site.** *Blood* 2009, **114**(8):1666-1674.
  151. Lancellotti S, Basso M, De Cristofaro R: **Proteolytic processing of von Willebrand factor by adamts13 and leukocyte proteases.** *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013, **5**(1):e2013058.
  152. Tersteeg C, de Maat S, De Meyer SF, Smeets MW, Barendrecht AD, Roest M, Pasterkamp G, Fijnheer R, Vanhoorelbeke K, de Groot PG *et al*: **Plasmin cleavage of von Willebrand factor as an emergency bypass for ADAMTS13 deficiency in thrombotic microangiopathy.** *Circulation* 2014, **129**(12):1320-1331.
  153. Feys HB, Roodt J, Vandeputte N, Pareyn I, Lamprecht S, van Rensburg WJ, Anderson PJ, Budde U, Louw VJ, Badenhorst PN *et al*: **Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (*Papio ursinus*).** *Blood* 2010, **116**(12):2005-2010.
  154. Monreal G, Sherwood LC, Sobieski MA, Giridharan GA, Slaughter MS, Koenig SC: **Large animal models for left ventricular assist device research and development.** *Asaio J* 2014, **60**(1):2-8.
  155. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F *et al*: **Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity.** *Med Microbiol Immunol* 2009, **198**(3):157-174.

156. Baral TN, MacKenzie R, Arbabi Ghahroudi M: **Single-domain antibodies and their utility.** *Curr Protoc Immunol* 2013, **103**:Unit 2 17.
157. Mohacsi P, Leprince P: **The CARMAT total artificial heart.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2014.
158. Fischer Q, Huisse MG, Voiriot G, Caron C, Lepage L, Dilly MP, Nataf P, Ajzenberg N, Kirsch M: **Von Willebrand factor, a versatile player in gastrointestinal bleeding in left ventricular assist device recipients?** *Transfusion* 2014.
159. Borel-Derlon A, Federici AB, Roussel-Robert V, Goudemand J, Lee CA, Scharrer I, Rothschild C, Berntorp E, Henriot C, Tellier Z *et al*: **Treatment of severe von Willebrand disease with a high-purity von Willebrand factor concentrate (Wilfactin): a prospective study of 50 patients.** *J Thromb Haemost* 2007, **5(6)**:1115-1124.



## **RESUME: Protéolyse du facteur von Willebrand et cardiopathies à forces de cisaillement élevées: nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques**

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié l'influence de soudaines variations de l'intensité des forces de cisaillement sur la multimérisation du VWF dans 3 modèles *in-vivo*: un modèle lapin de sténose de l'aorte ascendante, à l'initiation d'une assistance ventriculaire gauche par une pompe à flux continu chez des patients en insuffisance cardiaque terminale et lors d'un remplacement valvulaire aortique par voie percutané chez des patients avec un rétrécissement aortique sévère. Les variations observées du profil multimérique sont très dynamiques survenant quelques minutes après les modifications des conditions de flux. Notre étude met ainsi en évidence une nouvelle application potentielle du VWF comme biomarqueur d'anomalies de flux dans les cardiopathies à forces de cisaillement élevées. Un monitoring en temps réel du VWF pourrait notamment avoir un intérêt en cardiologie interventionnelle pour les techniques percutanées utilisées pour le traitement du rétrécissement aortique.

Dans la seconde partie, nous mettons en évidence l'intérêt d'une immunothérapie spécifique à base d'anticorps monoclonal pour la prévention de la dégradation du facteur von Willebrand (VWF) sous assistance circulatoire mécanique à flux continu. Via un anticorps monoclonal murin ciblant le domaine D4 du VWF et inhibant partiellement l'interaction VWF-ADAMTS13, une inhibition partielle de la dégradation du VWF est observée sur sang total dans un modèle *ex-vivo* d'assistance circulatoire mécanique.

La dernière partie de ce travail porte sur le développement d'un test ELISA pour le diagnostic des formes acquises ou constitutionnelles de maladie de Willebrand secondaire à une protéolyse excessive du VWF par l'ADAMTS13. Ce test pourrait constituer une alternative intéressante aux actuelles méthodes électrophorétiques pour le diagnostic et la prise en charge de ces pathologies hémorragiques.

**Mots clés: facteur Willebrand, forces de cisaillement, biomarqueur, immunothérapie, ELISA**

## **SUMMARY: VWF proteolysis and high-shear cardiovascular disorders: new diagnosis and therapeutic approaches**

In the first part of the thesis, we investigated the relationship between acute changes in shear stress and variations in VWF multimeric profile in three distinct models *in vivo*: in a rabbit aortic banding model, in end-stage heart failure patients at initiation of continuous-flow ventricular assist device therapy and in severe aortic stenosis patients undergoing percutaneous aortic valve procedures. Variations in VWF multimeric profile in those settings are highly dynamic occurring within minutes after changes in shear stress status. Our study highlights that VWF could be used as a biomarker of blood flow in high shear cardiovascular disorders. A bedside VWF-monitoring could be of clinical interest in interventional cardiology for percutaneous aortic valve procedures used in severe aortic stenosis.

In the second part of the thesis, we describe a novel approach based on antibody-based therapy to prevent the acquired von Willebrand factor (VWF) degradation observed in continuous-flow mechanical circulatory assist device therapy. Via a murine monoclonal antibody directed against VWF D4 domain and thus interfering with VWF-ADAMTS13 binding, a partial inhibition of VWF degradation is observed in whole blood using an *ex vivo* circulatory assist device model.

The last part of the thesis focused on the development of an ELISA-based diagnosis of constitutive or acquired VWF disorders associated with an increased ADAMTS13-mediated VWF proteolysis. Such assay might represent an attractive alternative to electrophoresis-based assays in the diagnosis and management of such bleeding disorders.

**Key words: Von Willebrand factor, shear stress, biomarker, antibody-based therapy, ELISA**