



HAL
open science

Thrombopénie néonatale révélant une maladie de Willebrand de type 2B : une cohorte nationale de 52 patients

Ilhem Rahal

► **To cite this version:**

Ilhem Rahal. Thrombopénie néonatale révélant une maladie de Willebrand de type 2B : une cohorte nationale de 52 patients . Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01695510

HAL Id: dumas-01695510

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01695510v1>

Submitted on 30 Mar 2018

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.



**Thrombopénie neonatale révélant une maladie de Willebrand
de type 2B : une cohorte nationale de 52 patients**

T H È S E - A R T I C L E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 2 Octobre 2017

Par Madame Ilhem RAHAL

Née le 27 décembre 1987 à Oran (ALGERIE)

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

D.E.S. d' HÉMATOLOGIE Option MALADIES DU SANG

Membres du Jury de la Thèse :

Monsieur le Professeur BLAISE Didier

Monsieur le Professeur CHAMBOST Hervé

Monsieur le Professeur MICHEL Gérard

Monsieur le Professeur MORANGE Pierre-Emmanuel

Président

Directeur

Assesseur

Assesseur

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Hervé CHAMBOST,

Vous m'avez fait l'honneur de me confier ce travail et de le diriger. J'ai pu profiter de votre enseignement dans le domaine de l'hémostase, faire progresser et améliorer ce travail et ce, dans la bonne humeur en toutes circonstances. J'ai beaucoup appris de vous. Veuillez trouver ici, Professeur, l'expression de ma gratitude et de ma profonde admiration.

A Monsieur le Professeur Didier BLAISE,

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Merci de m'avoir guidée dans mon orientation professionnelle, d'avoir été à l'écoute et d'avoir accepter mes choix à chaque étape de ma formation. Recevez ici, Monsieur, l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Gérard MICHEL,

Vous m'avez fait bénéficier de votre enseignement au sein de votre service. Cela a été une expérience enrichissante. Vous me faites l'honneur de juger ce travail, je vous en remercie.

A Monsieur le Professeur Pierre-Emmanuel MORANGE,

Merci de m'avoir accueillie dans votre service. J'en ai apprécié la diversité et la richesse grâce à votre équipe. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et de m'avoir aidé à l'améliorer. Je vous exprime toute ma reconnaissance.

A tous les Professeurs et Docteurs,

Pr Vey, Dr Bouabdallah, Pr André, Pr Chabannon, et Pr Barlesi

Dr Rey, Dr Etienne-Manopoulos, Dr Fezoui, Dr Coso, Dr Thuret, Dr (bébé) Herrmann, Dr Charbonnier, Dr Oudin, Dr Arnoux, Dr Loovsvled, Dr Niavaggioni, Dr Revon-Rivière, Dr Verschuur, Dr Gentet, Dr Rome, Dr Coze, Dr Legrand, Dr Fuerst, Dr Schiano, Dr Aurran-Schleinitz, Dr Stoppa, Dr Prebet, Dr Harbi, Dr Berger, Dr Calmels, Dr Lemarié, Dr Sohn, Dr Tomasini, Dr Baciuchka, Dr Grelier et au Dr Tertian

Pr Vivier et Sophie Ugolini pour m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche

Une spéciale dédicace à :

Tata D'incan, qui m'a appris à démasquer, débusquer, chasser et pourchasser, scanner, échographier, biopsier, traiter, dégommer, tuer, et que dis-je ! « Faire la visite avec des écouvillons de toutes les couleurs dans la poche » et prélever TOUTES les portes d'entrée, analyser par culture ou par PCR TOUTES les bactéries, virus et surtout les CHAMPIGNONS que tu affectionnes tant ! De 9h à 20h30 pendant 6 mois et encore après au 4828. Tu es exceptionnelle et ta secrétaire unique. **Angelina**, un amico è il campo che seminate con amore e mieta con riconoscenza (K. Gibran). **Nawel**, marathonnienne en herbe, dépêche toi de courir le Marseille-Cassis parce que, oui, j'ai toujours envie d'un plateau de 48 sushis. **Hacène**, merci pour ta gentillesse et ces supers visites...la prochaine fois, je mettrai des chaussures de running. Au **Grand Dr El Cheikh** e al **Grande Dr Crocchiolo**, vous êtes insupportables mais merci quand même pour ces leçons de vie à chaque déjeuner et pour les cours d'italien. **Claire G** : mon idole, il n'y a pas d'autre adjectif. **Cathy**, forte à l'extérieur et d'une grande sensibilité à l'intérieur. Merci de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir soutenue. Je garde en tête 2 mois intenses au protégé ! **Vincent**, la maman de TITAQUO voudrait ton 06-xx-xx-xx-xx.

A mes co-internes : Anne-Lise, l'unique (tu m'enverras la note de mes nombreuses consultations privées). Raynier, l'écrivain. Blandine, miss parfaite. Anne, ma biscotte. Brice, mon duo de rap italien. Archier, le fantôme. Sophie B, Sophie F. Maude ou le 84444. Elsa la reine des neiges. PBD, qui fait le moon-walk comme personne. Lakhdar (je t'ai déclassé), ne lâche rien : tu réussiras à mettre la noire du 1^{er} coup un jour. Nadia la folle. Marie-Amelie. Ferdidi, merci pour le chèque. Geoffroy. Colombe. Julien. Anne-Charlotte. Aude. Margaux. Ben. Claire. Francky. Clotilde. Clarissa. Audrey. Alexia. Yann. Thomas C, mon meilleur élève ;)

Marshmallow, pour m'avoir supporté de 5h à 22h, avec 1000 kilos sur le dos, sous un soleil de plomb au bord de la plage de Barcelone avec mes pauvres petits mollets (non j'exagère pas, c'est ce que j'ai ressenti).

BEA, le soleil du 4^{ème}, JE T'ADORE et MERCI POUR TOUT ! **SARRAH-BYC**, qui fait des ravages après son passage. **LOLO**, la solution à tous les problèmes.

La Timohematoped: MUMU, Lulu, Devos, Reus et Jerem qui m'ont appris qu'il ne fallait pas transfuser un enfant de 2 poches (Mr Chambost ne le sait pas) ; qu'il faut faire ¼ d'ampoule de spafon à un enfant de petite taille ; ½ amp pour un enfant de taille moyenne et 1 ampoule si « il a l'air assez grand ». Demoulin, Chacha, Bondet, Damour, Audrey, Caro, Arielle, Laura, Jeanne pour tes douceurs, Camille, Marie x3, Delphine, Virginie, Jimmy, Laeti, Steph, Carole, Angeli, Steph, Barbara et tous les autres (trop de monde). **La team de nuit de choc** : Lolotte, Johan et CriCri mais aussi Sophie et Julia qui m'ont juste perverti, nourri de trucs bizarres jusqu'à 4h du mat (oui pq après faut piquer les bilans) ; **OM1** pour les chouchous, chocolats et thé. **L'H1 que je ne saurait oublier** : Eric, Claire, Fanny, Max and Morgane. Coyo, Moucadel, Martine, Salima, Pascaline, Bene. **Les cytaphereurs** : Jerome, Mag, Sophie, Aurelie et Angel. **Les tech'**. **Le RFC Toulon** : Aron, Noel, Julien, Alex, Marie, Cecilia, Marine, Graz, Babette, Gabi et tutti quanti. **A VM**, mon réseau sans fil.

Sourire à la vie : Fred, Sylvie, Sauveur et Clotilde.

Aux Luminiens : le grand Toufik. Thierry le psychologue tunisien. Michel, le meilleur partenaire lors des parties secrètes de contrée. Roxane la winneuse. Linda qué linda. Guillaume, Nadia, Elisabeth, Yann, Sophie Guia, Emilie, Manon et Fabrice, le Corse.

A mes cher(e)s ami(e)s que j'adore

Anais, l'année prochaine on fête nos 20 ans

Claudia. Dacine. Clara. On fêtera nos 15 ans.

Myriam (no comment). Delphine. Ithar (notre week end nous attend). Mehdi. Marie. Abou (oui c'est mon pote). Roux. Thomas la gambas. Mélanie. Marie check the poo. Krikri. Vio.

A Ali, Tu as du supporter ma schizophrénie chaque jour, merci pour ton soutien sans faille. « Quand l'amour vous fait signe, suivez le. Bien que ses voies soient dures et rudes. Et quand ses ailes vous enveloppent, cédez-lui. Et quand il vous parle, croyez en lui. » K. Gibran

A ma Famille toute entière,

Mes parents, qui ont tout sacrifié car « C'est cela l'amour, tout donner, tout sacrifier sans espoir de retour » A. Camus.

Nawel, tu as toujours raison (je crois que je ne pouvais pas dire mieux pour te faire plaisir). **Amel**, la gentillesse incarnée. **Réda**, qui a mangé tous mes sandwiches, m'a saoulé avec « Comme dans un rêve » 7 soirs par semaine, ses jeans et costumes. J'attends toujours ma Audi sinon je récupère le maillot de Zizou. **Mes neveux** (et **nièces**, on ne sait jamais) qui sont justes UNIQUES. **Jug et Zahia**, qui doivent supporter les 2 autres ... Merci ! **Amine**, le Dr House des Urgences et mon cardiologue par téléphone.

Chawki, Radia et Yacine, ma 2eme famille et 2eme maison. **Susu. Neila**, la brillante danseuse étoile. **Maya**, la mathématicienne en herbe.

A tous mes oncles, tantes, cousins et cousines.

A tonton **Fethi**, Je garde mes meilleurs souvenirs d'enfance sur tes épaules.

A ma grand-mère paternelle, longue vie à toi. « Oui, j'ai eu mon Bac ».

A mes grands-pères et ma grand-mère maternelle que j'ai malheureusement si peu connus : merci de nous avoir transmis la valeur et la rigueur du travail, l'honnêteté, l'intégrité et l'humilité. Paix à leur âme.

Je vous dédie cette thèse.

RESUME

La maladie de Willebrand de type 2B (MW2B) est une maladie hémorragique rare, de transmission autosomique dominante. Elle se caractérise par une affinité augmentée de facteur von Willebrand (VWF) vis-à-vis du récepteur plaquettaire, la GPIIb-IIIa, qui est à l'origine d'une thrombopénie variable, majorant le risque hémorragique. Le diagnostic biologique de cette affection est difficile et la thrombopénie est le seul point d'appel.

Nous avons collecté toutes les observations néonatales des enfants nés dans les 10 dernières années diagnostiqués pour une MW2B dans un Centre du Réseau Français de prise en charge des Maladies Hémorragiques. Le phénotype clinico-biologique néonatal et la caractérisation moléculaire ont été décrits chez 52 enfants, dont 18 avec thrombopénie. Le diagnostic de thrombopénie néonatale a été posé chez 18 nouveau-nés. Parmi ces 18 cas, 12 avaient un antécédent familial de MW et 9 ont présenté un saignement cutané ou muqueux. Le taux médian de plaquettes était $10.5 \times 10^9/L$ (range, $4-127 \times 10^9/L$). Onze nouveau-nés ont reçu des transfusions plaquettaires ou des perfusions d'immunoglobulines. Seulement un patient a reçu du concentré de facteur Willebrand. Le délai diagnostique était très hétérogène allant de un jour à 36 mois, souvent retardé, même en cas d'antécédent familial.

Les mutations hétérozygotes du domaine A1 dans notre cohorte étaient : *R1341Q* (n=4), *V1316M* (n=3), *M1304insM* (n=3), *I1309V* (n=2), *L1460P* (n=2) et *R1306W* (n=2). Un patient avait une mutation homozygote (*P1337L*). La cinétique du taux de plaquettes semble être liée au profil mutationnel dans le 1^{er} mois de vie.

La MW2B est une cause rare de thrombopénie néonatale et son diagnostic doit être envisagé afin d'éviter un retard diagnostique et une prise en charge inadaptée.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCTION | 7 |
| 2. MATERIEL ET METHODES | 9 |
| 2.1. <i>COLLECTE DES DONNEES</i> | 9 |
| 2.2. <i>DONNEES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES</i> | 9 |
| 2.3. <i>ANALYSE STATISTIQUE</i> | 10 |
| 3. RESULTATS | 10 |
| 3.1. <i>CARACTERISTIQUES DES PATIENTS</i> | 10 |
| 3.2. <i>CORRELATION PHENOTYPE ET GENOTYPE POUR LA COHORTE ENTIERE</i> | 11 |
| 3.3. <i>CORRELATION PHENOTYPE ET GENOTYPE CHEZ LES NOUVEAU-NES AVEC THROMBOPENIE NEONATALE</i> | 11 |
| 3.4. <i>EVOLUTION DE LA THROMBOPENIE AU COURS DE LA PERIODE NEONATALE</i> | 12 |
| 4. DISCUSSION | 13 |
| 5. CONCLUSION | 16 |
| 6. TABLES ET FIGURES | 17 |
| 7. ARTICLE ORIGINAL | 23 |
| 8. REFERENCES | 33 |
| 9. TABLES AND FIGURES | 35 |
| 10. SUPPLEMENTAL DATA | 38 |
| 10.1. <i>SUPPLEMENTAL RESULTS</i> | 38 |
| 10.2. <i>SUPPLEMENTAL TABLES AND FIGURES</i> | 43 |
| 11. ABBREVIATIONS | 46 |

1. INTRODUCTION

Le facteur Willebrand (VWF) est une glycoprotéine multimérique synthétisée par les cellules endothéliales (80%) et les mégacaryocytes (20%). Il possède deux grands rôles dans l'hémostase : l'adhésion des plaquettes au vaisseau lésé et le transport du facteur VIII.

La maladie de Willebrand (MW), de transmission autosomique, est la maladie hémorragique constitutionnelle la plus fréquente dans le monde. Elle touche 1% de la population, sans différence selon le sexe. Cette maladie est la conséquence d'un défaut de quantité, de la structure ou de la fonction du VWF^{1,2}. Son expression clinico-biologique est très hétérogène, conséquence de la longueur du gène codant pour le VWF qui est la source d'une grande variété de type et de localisations des mutations. De plus, ces défauts moléculaires peuvent survenir sur plus d'un site fonctionnel de la glycoprotéine. Ainsi, on distingue trois grands groupes dans cette maladie : le déficit partiel quantitatif (type 1), les variantes qualitatives (type 2) et le défaut complet quantitatif en VWF (type 3)³.

Un panel d'examen biologiques spécifiques permet de caractériser le défaut du VWF ainsi que de classer le sous-type de MW : le dosage antigénique du VWF (VWF:Ag), l'activité cofacteur de la ristocétine du VWF (VWF:RCo) qui explore l'interaction entre le VWF et le complexe Gp1b/IX/V ; le dosage de l'activité du FVIII (FVIII:C) et l'étude des multimères selon leur poids moléculaire. La classification de la MW peut être confirmée par l'analyse moléculaire du gène codant pour le VWF.

La maladie de Willebrand de type 2B (MW2B) est un sous-type rare et de transmission autosomique dominante (5 à 8% des MW)⁴. Elle est caractérisée par une hyperaffinité du VWF pour le récepteur plaquettaire, la Gp1b α , qui se traduit par une agrégation plaquettaire spontanée ou à de faibles doses de ristocétine (RIPA < 0.8mg/ml)⁴. Elle peut s'associer à une thrombopénie modérée voire sévère⁵. Un défaut de multimères de haut poids moléculaires (MHPM), qui ont un pouvoir hémostatique élevé, participe à la survenue de saignements.

Quatre mutations spécifiques (*R1306W*, *R1341Q*, *R1308C* et *V1316M*) représentent environ 80% à 90% des MW2B. Elles résultent de la substitution d'un acide aminé au niveau du domaine A1 du gène codant pour le VWF⁶.

La thrombopénie dans la MW2B peut être modérée, sévère ou absente. Elle est accompagnée parfois d'agrégats plaquettaires et autres anomalies morphologiques (plaquettes géantes) sur le frottis sanguin qui peuvent rendre le compte plaquettaire difficile, mais orientent le diagnostic^{7,8}. Dans les situations de stress, tels qu'une chirurgie, une grossesse ou la période néonatale, la thrombopénie peut s'aggraver du fait de l'augmentation du taux de VWF circulant. Federici et al.⁹ ont rapporté une cohorte de 67 patients avec une MW2B et 30% avaient une thrombopénie à l'état basal. La thrombopénie et le risque hémorragique étaient associés lors de situations de stress telles que la grossesse, les infections ou une chirurgie⁹.

La gestion de la grossesse et de l'accouchement chez les femmes ayant une MW2B a été décrite¹⁰⁻¹⁶ mais peu de données sont disponibles sur la prévalence et l'impact de la

thrombopénie chez les nouveau-nés ayant une MW2B. Seulement 7 cas ont été rapportés dans la littérature et l'attitude thérapeutique n'est pas établie ^{7,12,13,17-19}.

Cette étude observationnelle et rétrospective concerne les enfants nés durant la dernière décennie et ayant une MW2B. Les cas ont été collectés à travers le réseau national Français des centres pour les maladies hémorragiques. L'objectif était de décrire l'impact de la thrombopénie dans le diagnostic et la gestion de la MW2B dans la période néonatale. De plus, nous souhaitons comparer le phénotype clinique et moléculaire des enfants avec ou sans thrombopénie néonatale diagnostiqués pour une MW2B.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Collecte des données

Nous avons envoyé un questionnaire à tous médecins en charge des enfants ayant une maladie hémorragique héréditaire dans tous les centres faisant parti du réseau français pour les maladies hémorragiques rares.

Les enfants ayant un diagnostic de MW2B et nés dans les 10 dernières années (entre le 1er Janvier 2006 et le 31 Décembre 2015), étaient inclus dans l'étude. Les parents ou tuteurs légaux de ces derniers ont été informés sur les objectifs et les modalités de l'étude et ont approuvé l'inclusion de leurs enfants et ce, en accord avec la Déclaration d'Helsinki. L'étude a été approuvée par le Comité d'Ethique de la Société Française de Pédiatrie.

Afin de s'assurer de l'exhaustivité des données collectées à partir des centres, nous avons comparé notre cohorte à la base de données du Centre de Reference pour la Maladie de Willebrand (CRMW) et du Réseau FranceCoag.

2.2. Données Cliniques et biologiques

Toutes les données clinico-biologiques de la période néonatale ont été collectées (de la naissance jusqu'au 28ème jour de vie). Les données cliniques étaient : les antécédents familiaux de maladie hémorragique, les modalités d'accouchement, les complications obstétricales, la présence ou non de manifestations hémorragiques à la naissance et ses caractéristiques.

Les numérations plaquettaires ainsi que la morphologie des plaquettes au frottis sanguin (présence ou non d'agrégats par exemple) ont été collectées lors de période néonatale. La thrombopénie était définie comme un taux plaquettaire $< 150 \times 10^9/L$. Si le taux de plaquettes sur tube EDTA n'était pas disponible, le compte sur tube citraté était considéré.

L'âge au diagnostic de MW2B et les hypothèses diagnostiques évoquées étaient notés. Etaient également collecté : les thérapeutiques administrées ainsi que leur fréquence et délai (transfusions plaquettaires (CPA) ou de globules rouges (CGR), perfusions d'immunoglobulines (IgIV) ou de concentrés de VWF).

Les données biologiques comprenaient : les données relatives au VWF (VWF :Ag, VWF :RCo, le ratio VWF :RCo/VWF :Ag, étude des multimères, test RIPA et analyse moléculaire du domaine A1) et à l'hémostase. Enfin, le délai écoulé entre l'exploration de la MW et la découverte de la thrombopénie a été noté.

2.3. Analyse statistique

Les variables continues étaient exprimées en moyenne, médiane et écart type. La comparaison entre les groupes était réalisée à partir du test de Mann et Whitney, lorsque nécessaire. Le logiciel SPSS a permis de réaliser les analyses statistiques.

3. RESULTATS

3.1. Caractéristiques des patients

Parmi les 31 centres : 13 ont rapportés au moins un cas et 18 ont déclarés ne pas en avoir. Ainsi, une cohorte de 52 enfants diagnostiqués pour une MW2B et nés dans les 10 dernières années a pu être constituée.

Parmi eux, 2 cas avaient déjà été décrits avec un diagnostic de thrombopénie néonatale avec une double mutation hétérozygote de type New-York de MW2B et de pseudo-Willebrand²⁰. Etant donné que la thrombopénie n'était pas liée à la mW2B, ces deux cas seront décrits séparément des 2 groupes avec ou non thrombopénie néonatale.

Dix-huit cas (35%) avaient une thrombopénie néonatale avérée (8 garçons et 10 filles). Les caractéristiques des patients classés selon la présence ou non d'une thrombopénie néonatale sont montrées dans la table 1. Seulement 12 (67%) des nouveau-nés thrombopéniques versus 28 (88%) des enfants sans thrombopénie néonatale avaient des antécédents familiaux de MW2B. La cause diagnostique était les saignements cutanés ou muqueux (pétéchies, ecchymoses) chez 50% les enfants thrombopéniques et les antécédents familiaux chez 66% des enfants non-thrombopéniques. Les saignements cutané-muqueux (ecchymoses et pétéchies) étaient les manifestations hémorragiques les plus fréquentes dans les 2 groupes (respectivement 50% et 19% des enfants avec et sans thrombopénie néonatale).

Parmi les 18 nouveau-nés thrombopéniques, le taux médian de plaquettes était de $10.5 \times 10^9/L$ (range, 4-127) associé à des agrégats plaquettaires chez 56% (10/18) sur le frottis sanguin. Seulement 3 nouveau-nés sur 15 avaient une anomalie sur le bilan d'hémostase (TCA allongé). Le délai médian diagnostique de MW2B pour la cohorte entière était de 36 mois [range : 1 jour ; 60 mois] et avec une différence entre les enfants avec thrombopénie néonatale par rapport à ceux qui n'en avaient pas (respectivement, 4.8 mois [range : 1 jour ; 36 mois] versus 24 mois [range: 0-60 mois] ; $p < 0.01$).

Le premier diagnostic évoqué devant la thrombopénie néonatale était l'alloimmunisation materno-fœtale. Malgré des arguments en faveur de ce diagnostic (incompatibilité entre les parents), aucune confirmation n'était retrouvée. Le 2^{ème} diagnostic évoqué était l'existence d'un terrain auto-immun chez la mère qui serait responsable de la transmission d'anticorps IgG anti-plaquettes transmis par voie trans-placentaire. Egalement, une cause centrale était parfois évoquée et infirmée par un myélogramme. En conséquence, les nouveau-nés

bénéficiaient de perfusions d'IgIV et de transfusions plaquettaires (85% d'entre eux). Une seule patiente (cas n°1, supplemental data) a bénéficié d'un traitement adéquat basé sur la perfusion de concentré de VWF à J12 de vie.

3.2. Corrélation phénotype et génotype pour la cohorte entière

L'analyse du gène codant pour le domaine A1 du VWF au niveau de l'exon 28 a été réalisée chez tous les enfants sauf pour deux. Quinze différentes mutations hétérozygotes au niveau du domaine A1 du VWF ont été retrouvées.

La table n°2 montre toutes les mutations retrouvées selon la présence ou non d'une thrombopénie néonatale. Parmi les enfants ayant une thrombopénie néonatale, 7 mutations connues²¹⁻²⁵ avaient été identifiées: *R1341Q* (n=4), *V1316M* (n=3), *M1304insM* (n=3), *I1309V* (n=2), *L1460P* (n=2), *R1306W* (n=2) and *P1337L* (n=1) (Table n° 2).

La mutation *R1341Q* était la plus fréquente dans les 2 groupes et concernait 17 enfants dont 4 avec une thrombopénie néonatale.

Les mutations *R1306W* et *P1337L* étaient observées dans les deux groupes mais un enfant avec thrombopénie néonatale avait une mutation homozygote de *P1337L*. Les mutations *V1316M*, *L1460P*, *I1309V* et *M1304insM* étaient observées exclusivement chez les enfants avec thrombopénie néonatale. Une grande variété de mutations étaient retrouvées chez les patients non thrombopéniques telles que : *R1341W*, *P1266L*, *C1272Y*, *R1306Q*, *H1268G*, *V1279I* et *R1308C*.

3.3. Corrélation phénotype et génotype chez les nouveau-nés avec thrombopénie néonatale

Des manifestations hémorragiques ont été observées chez tous les nouveau-nés thrombopéniques ayant une mutation *V1316M* et *L1460P*. Seulement la moitié des enfants mutés pour *R1341Q* et *R1306W* étaient symptomatiques (table n°3). Les nouveau-nés mutés *R1341Q* qui ont eu des saignements avaient eu des complications obstétricales nécessitant le recours à des manipulations traumatiques (voir annexe S1). Les nouveau-nés asymptomatiques avaient été explorés soit suite à l'histoire familiale soit de manière fortuite (voir supplemental data).

Des taux de VWF:RCo élevés étaient observés dans les 15 premiers jours de vie chez deux sur six nouveau-nés (mutés *I1309V*). L'analyse des multimères du VWF montrait l'absence de PPHM (10 cas). Le test RIPA montrait une agrégation plaquettaire à faibles doses de ristocétine chez 12 enfants parmi les 18 qui ont bénéficié de ce test. La biologie moléculaire a confirmé le diagnostic de MW2B chez tous les enfants thrombopéniques excepté un cas (le diagnostic a été posé sur le test RIPA et du fait de l'histoire familiale de MW2B pour le cas n°7).

Les données clinico-biologiques à la naissance sont détaillées pour chaque cas selon l'anomalie moléculaire détectée dans la table n°3 (présence d'hémorragie cutanéomuqueuse ou non ; taux de plaquettes ainsi que la présence ou non sur le frottis sanguin d'agrégats ; le taux de VWF :RCo et le ratio VWF :RCo/VWF :Ag ; le test RIPA et le profil multimérique)

3.4. Evolution de la thrombopénie au cours de la période néonatale

Parmi les 18 patients thrombopéniques, 12 avaient eu une numération sanguine à la naissance et six avant J4, révélatrice de la thrombopénie (figure 1): 13 avaient en dessous de $20 \times 10^9/L$, un entre 20 et $50 \times 10^9/L$, trois entre 50 et $100 \times 10^9/L$, et un avait plus de $100 \times 10^9/L$. En ce qui concerne le cas n°4 (voir annexe), les explorations ont débuté vers le J40. Entre J10 et J15, les données étaient disponibles pour 11 patients. Six avaient un taux de plaquettes au-dessus de $50 \times 10^9/L$. Parmi les cinq patients restants : seul le cas n°4 avait atteint le seuil de $50 \times 10^9/L$ dans le 1^{er} mois de vie (muté *R1341Q*) et les quatre autres restaient thrombopéniques et avaient soit une mutation *V1316M* (case n°6 et n°10) soit *L1460P* (case n°3 et n°5, voir annexe).

La figure 1 montre l'évolution de la thrombopénie au cours du 1^{er} mois de vie selon le statut mutationnel. Les patients mutés *R1341Q* et *R1306W* avaient une thrombopénie moins sévère avec un taux médian de plaquettes qui atteignait rapidement le seuil de $100 \times 10^9/L$ (figure S1A). Les patients mutés *I1309V* atteignaient le seuil de $60 \times 10^9/L$ entre J10 et J15 et le seuil de $50 \times 10^9/L$ à J30 (figure S1B). Les nouveau-nés mutés *V1316M*, *L1460P*, *P1337L* et *M1304insM* restaient en dessous du seuil de $50 \times 10^9/L$ pendant le 1^{er} mois de vie (figure S1C).

4. DISCUSSION

Le gain de fonction acquis par le VWF dans la MW2B lui confère une hyperaffinité pour le récepteur à la surface des plaquettes, la GPIIb-IIIa^{8,26,27}. Le stress physiologique provoqué lors de la période néonatale risqué de majorer le risque de thrombopénie dans la MW2B suite au relargage massif de VWF circulant dans le sang. Sept cas de thrombopénie néonatale secondaire à une MW2B ont été rapportés dans la littérature^{7,12,13,17-19}. Notre étude de 52 nouveau-nés, qui avait pour objet d'évaluer l'incidence de la thrombopénie néonatale liée à la MW2B, est la première et la plus conséquente cohorte chez le petit enfant rapportée dans la littérature à notre connaissance.

Nous avons observé 36% de nouveau-nés avec thrombopénie néonatale. Federici a rapporté une fréquence de la thrombopénie comparable à notre cohorte, entre 30% et 40%, chez 67 patients (âge moyen de 42 ans; [6-87])⁹. Suite à un stress tel qu'une infection, une chirurgie ou une grossesse, la fréquence était multipliée par deux et était associée à un sur-risque hémorragique. Notre étude sous-estime peut-être la fréquence de la thrombopénie chez ces enfants nés avec une MW2B étant donné que peu d'enfants non-thrombopéniques (n=32) avaient bénéficié d'une numération sanguine à la naissance. En effet, la moitié des enfants avec une thrombopénie documentée étaient asymptomatiques à la naissance ce qui renforce cette hypothèse.

Le profil clinique et biologique peut être très hétérogène selon les cas et ce, au sein même d'une famille^{13,28,29}. Les signes cliniques les plus fréquents chez les enfants thrombopéniques dans notre cohorte étaient les saignements spontanés cutanés ou muqueux (62%), mais parfois aussi traumatiques comme les bosses séro-hématique. Malgré des accouchements traumatiques, aucun saignement intra-cérébral sévère n'a été rapporté. Cela suggérerait que les conditions hémostatiques sont différentes par rapport aux nouveau-nés hémophiles³⁰. Un seul cas grave a été observé (choc hémorragique chez le cas n°10).

Les enfants non-thrombopéniques ont été diagnostiqués vers l'âge de 2 ans. Au diagnostic, ils avaient tous un taux de plaquettes normal et aucune thrombopénie n'a été rapportée suite à un stress telle qu'une chirurgie ou autre. Aucun événement au cours de la période néonatale n'a été noté dans ce groupe.

De façon intéressante, les antécédents familiaux de MW chez les enfants thrombopéniques (13 cas, 72%) n'étaient pris en compte dans la stratégie diagnostique que chez 7 cas (54%) parmi 13. Malheureusement, les 6 autres cas ont eu des saignements, des examens diagnostiques inappropriés et des thérapeutiques inefficaces. Le diagnostic de MW2B devrait être évoqué en 1er lieu chez les nouveau-nés thrombopéniques avec une histoire familiale de MW2B. Cela permettrait d'obtenir un diagnostic rapide et d'adapter au mieux la prise en charge thérapeutique.

Le délai diagnostique de la MW2B était très hétérogène allant du 1er jour de vie à l'âge de 36 mois. Le retard diagnostique peut être délétère et générer une perte de chance réelle pour bénéficier d'un traitement optimal comme pour le cas n°10. De plus, les thrombopénies

“chroniques” d’étiologie indéterminée peuvent conduire à des examens inutiles voir invasifs tel qu’un myélogramme.

Le diagnostic clinique et biologique de la MW n’est pas aisé. Etant donné le défaut de sensibilité du dosage de VWF:RCo à la naissance, les examens biologiques doivent d’être répétés. En effet, le relargage massif de VWF lors de la période néonatale peut fausser certains paramètres biologiques et rendre le diagnostic difficile. Ainsi, un taux normal de VWF :RCo et VWF :Ag n’exclut pas le diagnostic.

L’analyse du frottis sanguin doit être minutieuse étant donné que nous avons observé des agrégats plaquettaires chez 6% des cas. Les résultats biologiques sont probablement plus facile d’interprétation entre le 1er et 3ème mois de vie, lorsque le taux de plaquettes dépasse le seuil de $50 \times 10^9/L$. En l’absence d’antécédent familial de maladie hémorragique, la numération à la naissance doit systématiquement être accompagnée d’un bilan d’hémostase, voir dans les cas les plus difficiles, l’exploration des paramètres du VWF. En effet, on propose de réaliser dans un 1er temps le dosage du PFA-100 si le taux de plaquettes est au moins au-dessus de $50 \times 10^9/L$; puis, le test RIPA si ce taux se maintient au-delà $50 \times 10^9/L$. Dans les situations difficiles avec un taux inférieur à $50 \times 10^9/L$, la biologie moléculaire et/ou le bilan d’hémostase peuvent être réalisés chez les parents afin de documenter le diagnostic de MW2B. Evidemment, les autres diagnostics plus courant (allo ou auto-immunisation). En présence d’antécédent familial de MW2B, une numération sanguine avec analyse du frotti sanguin doit être systématique chez le nouveau-né afin de s’assurer de la présence ou non d’une thrombopénie néonatale.

Tous les enfants thrombopéniques ont été diagnostiqués pour une MW2B par biologie moléculaire lorsqu’elle était demandée (17/18). Ainsi, nous avons pu comparer le phénotype clinique et biologique en fonction du statut mutationnel. Il a déjà été rapporté que le profil hémorragique et la thrombopénie variaient selon le statut mutationnel ^{10,14,16}. Deux enfants avec une MW2B de type New York (*P1266L*) et thrombopéniques ont été exclus de l’analyse étant donné la présence concomitante d’un pseudo-Willebrand, à l’origine de la thrombopénie (*T1034del*) ²⁰.

Federici a montré que le score hémorragique était inversement corrélé au taux de plaquettes et ce, à l’état basal et suite à un stress ⁹. Les patients mutés *V1316M* avaient un score hémorragique élevé et une thrombopénie profonde après un stress ($< 50 \times 10^9/L$). Ceux qui avaient une mutation *I1309V*, *R1306W* ou *R1341Q* avaient un score hémorragique intermédiaire ainsi qu’une thrombopénie modérée entre 50 et $100 \times 10^9/L$ et parfois au-delà après un stress. Nos résultats sont concordants et élargissent ces observations jusqu’à la période néonatale. En effet, les patients mutés *V1316M* étaient les cas les plus sévères dans notre cohorte, particulièrement pour le cas n°10. Les cas les plus transfusés pendant la période néonatale étaient ceux mutés *V1316M* et *L1460P*. Les nouveau-nés mutés *R1341Q* présentaient des saignements suite à des manipulations traumatiques. Aucun saignement spontané n’avait été observé chez les nouveau-nés mutés pour *R1341Q*, *I1309V* et *M1304insM*.

Dans notre cohorte, nous avons observé trois groupes avec un profil d'évolution de la thrombopénie différent dans le 1er mois de vie relatif à leur statut mutationnel : les enfants mutés *V1316M*, *L1460P*, *P1337L* et *M1304insM* avaient une thrombopénie très sévère en dessous de $50 \times 10^9/L$; les enfants mutés *I1309V* avaient une thrombopénie sévère entre 50 et $100 \times 10^9/L$ et ceux mutés *R1341Q* et *R1306W* qui avaient une thrombopénie modérée au-delà de $100 \times 10^9/L$. Ces observations sont limitées par le faible effectif de patients. Mais, notre cohorte reste représentative de la population nationale diagnostiquée pour une MW2B dans les 10 dernières années. Ainsi, cela confirme l'existence d'un lien entre le phénotype et le profil moléculaire chez les patients exposés à un stress. De plus, une corrélation entre la génétique et la cinétique du taux de plaquettes suite à un stress est fortement suggérée par ces observations.

En conclusion, cette série est la première à rapporter une cohorte de 52 cas pédiatriques de MW2B dont 18 avec thrombopénie néonatale à notre connaissance. Nous avons essayé de collecter tous les cas pédiatriques dans la dernière décade en France. Etant donné l'absence de déclaration du sous-type de MW auprès du réseau FranceCoag, le registre national des maladies hémorragiques héréditaires n'a pas permis d'utiliser cette base de données comme source d'information ³¹. Les informations transmises par les centres sont concordantes avec les bases de données nationales ce qui confirme l'exhaustivité de notre recueil malgré le fait que seulement 13 centres aient déclaré des cas.

Parfois, malgré les complications hémorragiques et la thrombopénie, le diagnostic de MW2B n'est pas établi. De plus, on ne peut pas exclure le fait que des thrombopénies néonatales soient passés inaperçues. Notre étude peut être un élément de réflexion afin d'élaborer une stratégie diagnostique et thérapeutique de la MW2B en période néonatale. Le caractère héréditaire et dominant doit faire partie de cette stratégie. Puisque la thrombopénie dans la MW2B est un facteur de risque hémorragique indépendant, on propose de réaliser systématiquement une numération plaquettaire avec analyse du frottis sanguin chez les enfants issus d'un parent porteur de la MW2B.

Le diagnostic biologique et les tests spécifiques sont difficiles d'interprétation mais doivent tout de même être évoqué et réalisés. Un diagnostic méconnu peut conduire à des investigations voir des traitements inappropriés et représenter une perte de change pour le patient en cas d'hémorragie. Il faut noter que les antécédents familiaux ne sont pas toujours pris en compte dans cette étude. Enfin, étant donné que l'interprétation des résultats biologiques peut être parfois difficile, la biologie moléculaire doit être envisagé tôt, au moins lorsqu'il existe une histoire familiale.

5. CONCLUSION

La MW2B est rare et sa transmission est autosomique dominante. Sa particularité est liée à une hyperaffinité du Facteur Willebrand vis-à-vis du récepteur plaquettaire GPIIb- α , qui est à l'origine d'une thrombopénie variable, majorant le risque hémorragique. La variabilité inter et intra-individuelle et même au sein d'une famille peut être un piège diagnostique. En effet, lors de situations de stress telles que la grossesse, un épisode infectieux ou une chirurgie, la gestion du patient atteint reste mal codifiée mais ce sont des situations attendues et « connues ». La période néonatale est également une période à risque, pour le nouveau-né atteint, car le diagnostic n'est pas posé et la thrombopénie néonatale peut être le seul point d'appel.

Nous nous sommes intéressés à ces nouveau-nés et nous avons pu constater que le diagnostic est souvent difficile mais aussi peu évoqué. En effet, des néomutations ont pu être rapportées et la rareté de cette maladie est source d'erreurs diagnostiques et thérapeutiques. Malheureusement, le relargage physiologique massif de VWF rend la thrombopénie profonde et le risque hémorragique accru. On insistera sur l'importance de l'interrogatoire à la recherche d'antécédents familiaux de maladie hémorragique et l'intérêt, lors des situations diagnostiques difficiles, d'avoir recours à l'exploration des paramètres de l'hémostase et du VWF. Enfin, lorsque l'histoire familiale est connue, la réalisation d'une numération plaquettaire à la naissance peut s'avérer utile et permettrait aussi de mieux documenter la fréquence de la thrombopénie néonatale secondaire à la MW2B.

Notre étude nationale portant sur 52 enfants nés sur une période dix ans dont 18 avec thrombopénie néonatale documentée apporte des informations non rapportées jusque-là. Elle suggère l'existence d'un lien entre phénotype et génotype chez les patients atteints de MW2B mais aussi un lien entre la cinétique de disparition de la thrombopénie et le génotype lorsqu'on s'éloigne de la période de stress. Ces observations ont déjà été rapportées chez l'adulte dans la littérature et notre étude les met en évidence chez les nouveau-nés. Certaines mutations « hémorragiques » telle que *V1316M* sont associées à des saignements parfois graves et à une reconstitution plaquettaire lente après l'accouchement. D'autres, comme *R1341Q*, moins sévères phénotypiquement, associées à des saignements traumatiques, se caractérisent par une hyperaffinité plaquettaire moindre. Ces observations pourront servir à établir des recommandations quant à la gestion diagnostique et thérapeutique dans la MW2B lors de situations de stress physiologiques selon le génotype.

En conclusion, la MW2B est une cause rare de thrombopénie néonatale dont le diagnostic peut être facile en cas d'antécédents familiaux. La réalisation d'une analyse moléculaire dans ces cas pourrait optimiser la prise en charge de ces nouveau-nés. Devant une thrombopénie inexplicquée sans histoire familiale, la recherche attentive d'une maladie de Willebrand 2B chez le nouveau-né ou les parents est nécessaire.

6. TABLES ET FIGURES

Table 1. Caractéristiques des patients issus de l'ensemble de la cohorte.

| | Patients avec thrombopénie néonatale | Patients sans thrombopénie néonatale * |
|---|--------------------------------------|--|
| Nombre | 18 | 32 |
| Sexe (Masculin/Feminin) | 8/10 | 17/15 |
| Antécédents familiaux de MW2B | 60% | 88% |
| Age au diagnostic (mois) | 4.8 months | 24 months |
| Médiane (range) | 0-36 months | 0-60 months |
| Causes diagnostiques | | |
| - Antecedent familial | 7 | 21 |
| - Fortuit | 2 | 5 |
| - Saignement cutané (Hémorragie sévère) | 9 (1) | 6 (1) |

*Parmi les 32 patients sans thrombopénie néonatale documentée, ils avaient tous au moins un bilan sanguin avec un taux de plaquettes normal.

Deux nouveau-nés ont été exclus : ils avaient une thrombopénie néonatale et diagnostiqués pour une MW2B de type New-York et un pseudo-Willebrand

Table 2. Profil mutationnel pour tous les patients

| | Patients avec thrombopénie néonatale (N) | Patients sans thrombopénie néonatale (N) | Tous (N) |
|------------------|--|--|-----------|
| <i>R1341Q</i> | 4 | 13 | 17 |
| <i>R1306W</i> | 2 | 2 | 4 |
| <i>I1309V</i> | 2 | 0 | 22 |
| <i>V1316M</i> | 3 | 0 | 3 |
| <i>L1460P</i> | 2 | 0 | 2 |
| <i>P1337L</i> | 1 | 2 | 3 |
| <i>M1304insM</i> | 3 | 0 | 3 |
| Non réalisé | 1 | 1 | 2 |
| Autres | 0 | 16* | 16* |
| Total | 18 | 34 | 52 |

* *P1266L* (n=4); *P1266L* and *T1034del* (n=3); *R1341W* (n=3); *C1272Y* (n=2); *R1306Q* (n=2); *V1279I* (n=2); *H1268G* (n=2); *R1308C* (n=1)

Table 3. Phénotype et profil mutationnel des nouveau-nés thrombopéniques

| Mutation | Cas (n°) | Type de saignement | 1er compte plaquettes (x10 ⁹ /L) | Agrégats | VWF:RCo, U/dL | VWF Rco/A ₅ , ratio | Test RIPA | Profil Multimères |
|------------------|----------|------------------------------|--|----------|------------------|-----------------------------------|-----------|----------------------|
| R1341Q | Cas 2 | Cutanéo-muqueux | 95 | Non | 54 | 0.6 | NR | NR |
| | Cas 8 | Cutanéo-muqueux | 10 | Non | 19 | 0.56 | Positive | Absence PHPM |
| | Cas 9 | - | 90 | Non | 18 | 0.42 | Positive | Absence PHPM |
| | Cas 14 | - | 11 | Oui | <7 | 0.14 | NR | Absence PHPM |
| R1306W | Cas 1 | Cutané | 13 | Oui | 42 | 0.43 | Positive | NR |
| | Cas 15 | - | 19 | Oui | <13 | 0.32 | Positive | Absence PHPM |
| I1309V | Cas 12 | - | 20 | Non | 146 | - | Positive | NR |
| | Cas 13 | - | 127 | Non | 137 | 0.92 | NR | NR |
| V1316M | Cas 4 | Cutané | 10 | Oui | 10 | 0.3 | NR | Absence PHPM |
| | Cas 6 | Cutané | 6 | Oui | 15 | 0.38 | Positive | Absence PHPM |
| | Cas 10 | Cutané, choc hémorragique | 21 | Non | 10 | 0.32 | Positive | Absence PHPM |
| L1460P | Cas 3 | Cutané | 7 | Oui | 8 | 0.08 | Negative | NR |
| | Cas 5 | Cutané | 8 | Oui | 10 | 0.3 | NR | NR |
| M1304insM | Cas 16 | - | 19 | Oui | <13 | 0.32 | Positive | Absence PHPM |
| | Cas 17 | - | 5 | Oui | 6 | 0.15 | Positive | Absence PHPM |
| | Cas 18 | - | 4 | Oui | 2 | 0.32 | Positive | Absence PHPM |
| P1337L | Cas 11 | Cutané | 5 | Oui | <7 | 0.14 | NR | Absence PHPM |
| | Cas 7 | - | 9 | Oui | 26 | 0.48 | Positive | NR |

NR: non réalisé; RIPA: ristocetin-induced platelet aggregation; PHPM: protéins de haut poids moléculaire

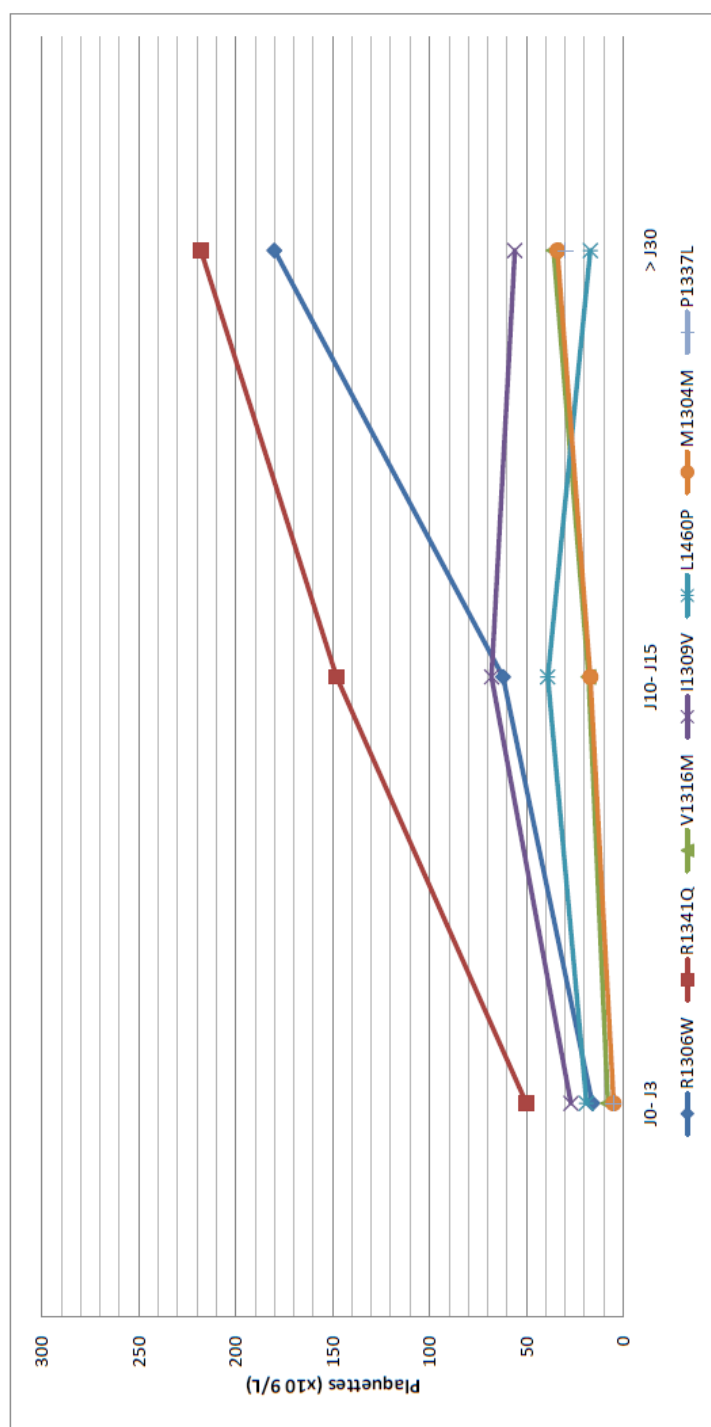


Figure 1. Evolution de la thrombopénie au cours du 1er mois de vie selon le profil mutationnel

Les cas n°2, 8, 9 et 14 avaient une mutation *R1341Q*; les cas n°4, 6 et 10 une mutation *V1316M*; les cas n°12 et 13 une mutation *I1309V*; les cas n°1 et 15 une mutation *R1306W*; les cas n°3 et 5 une mutation *L1460P*; les cas n°16, 17 et 18 une mutation *M1304insM* et le cas n°11 avait une mutation homozygote *P1337L*. Trois populations peuvent être individualisées: la 1ère est celle des patients qui atteignent le seuil de $100 \times 10^9/L$ dans le 1er mois de vie (*R1341Q* et *R1306W*); la seconde concernent ceux qui rejoignent le seuil de $50 \times 10^9/L$ dans le 1er mois de vie (*I1309V*) et enfin, le 3^{ème} groupe dont les patients n'atteignent pas le seuil de $50 \times 10^9/L$ dans le 1er mois de vie (*V1316M*, *L1460P*, *P1337L* and *M1304insM*)

Table S1. Caractéristiques des patients, complications obstétricales, phénotype néonatal et traitements instaurés

| | Antécédents Familiaux | Accouchement | Type d'hémorragie | Taux plaquettes (x10 ⁹ /L) | Présence d'agrégats | Morphologie plaquettaire | Transfusions plaquettes (n) | Perfusions IgIV (n) | Concentré VWF |
|--------|-------------------------|---------------------------|--|---------------------------------------|---------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------------------|
| Cas 1 | Père, frère | Voie basse | Petechies | 13 | Oui | - | 8 | 3 | 12 ^{ème} jour de vie |
| Cas 2 | Mère | Voie basse, instrumentale | Bosse sérosanguine, Hémorragie conjonctivale | 95 | Non | - | - | - | - |
| Cas 3 | - | Voie basse | Petechies | 7 | Oui | - | 9 | 2 | - |
| Cas 4 | - | Voie basse | Petechies | 10 | Oui | - | - | - | - |
| Cas 5 | - | Voie basse | Ictere, Petechies | 8 | Oui | Plaquettes géantes | 9 | 1 | 485 ^{ème} jour |
| Cas 6 | - | Voie basse | Petechies | 6 | Oui | - | 7 | 2 | - |
| Cas 7 | Père | Voie basse | - | 9 | Oui | - | 0 | 0 | - |
| Cas 8 | Mère | Voie basse, instrumentale | Petechies, ecchymoses | 10 | Non | - | 1 | 4 | - |
| Cas 9 | Père, oncle | Voie basse | - | 90 | Non | - | 1 | 2 | - |
| Cas 10 | - | Voie basse | Petechies, choc hémorragique | 21 | Non | - | 12 | 5 | - |
| Cas 11 | Thrombopénie maternelle | Voie basse | Petechies | 5 | Oui | - | 2 | 2 | Oui |
| Cas 12 | Père, oncle | Voie basse | - | 20 | Non | - | 2 | 2 | - |
| Cas 13 | Père, oncle, frère | Voie basse | - | 127 | Non | - | 1 | 0 | 18 ^{ème} mois |
| Cas 14 | Mère | Voie basse, instrumentale | - | 11 | Oui | Plaquettes géantes | 3 | 3 | - |
| Cas 15 | Mère, soeur | Voie basse | - | 19 | Oui | - | - | - | - |
| Cas 16 | Père, frère, oncle | Voie basse | - | 19 | Oui | Plaquettes géantes | - | - | - |
| Cas 17 | Père, frère, oncle | Voie basse | - | 5 | Oui | - | - | - | - |
| Cas 18 | Mère | Césarienne | - | 4 | Oui | Petites plaquettes | - | - | - |

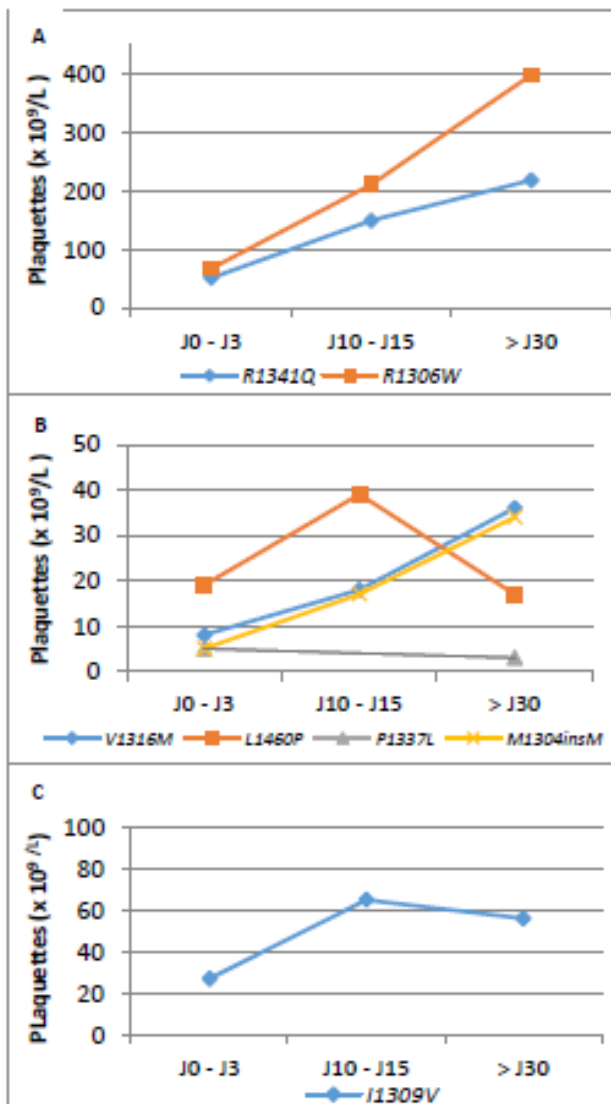
Ig IV immunoglobulines par voie intraveineuse

Table S2. Données biologiques concernant le diagnostic de la MW2B chez les 18 patients avec thrombopénie néonatale

| | Age au 1er bilan | FVIII: C (U/dL) | VWF: Ag (U/dL) | VWF:RCo (U/dL) | VWF:RCo/Ag | RIPA | Etude des multimères | Mutation |
|--------|------------------|-----------------|----------------|----------------|------------|---------|----------------------|-----------|
| Cas 1 | J4 | 61 | 97 | 42 | 0.43 | Positif | NR | R1306W |
| | J45 | 54 | 50 | 15 | 0.30 | | | |
| Cas 2 | J150 | ND | 90 | 54 | 0.60 | NR | NR | R1341Q |
| Cas 3 | J13 | 90 | 105 | 8 | 0.08 | Négatif | NR | L1460P |
| Cas 4 | J90 | 45 | 33 | 10 | 0.30 | NR | Absence PHPM | V1316M |
| Cas 5 | J365 | 52 | 27 | 10 | 0.37 | NR | NR | L1460P |
| Cas 6 | J138 | 35 | 39 | 15 | 0.38 | Positif | Absence PHPM | V1316M |
| Cas 7 | J120 | 30 | 54 | 26 | 0.48 | NR | NR | ND |
| Cas 8 | J1080 | 55 | 34 | 19 | 0.56 | Positif | Absence PHPM | R1341Q |
| Cas 9 | J16 | 48 | 18 | 18 | 0.42 | Positif | Absence PHPM | R1341Q |
| Cas 10 | J240 | 28 | 31 | 10 | 0.32 | Positif | Absence PHPM | V1316M |
| Cas 11 | J390 | 28 | 48 | <7 | 0.14 | NR | Absence PHPM | P1337L |
| Cas 12 | J3 | - | - | 146 | - | Positif | NR | I1309V |
| | J480 | 68 | 65 | 33 | 0.50 | | | |
| Cas 13 | J1 | - | 149 | 137 | 0.92 | NR | NR | I1309V |
| | J540 | 60 | 69 | 23 | 0.33 | | | |
| Cas 14 | J210 | 34 | 27 | 11 | 0.41 | Positif | NR | R1341Q |
| Cas 15 | J0 | 17 | 41 | <13 | 0.32 | Positif | Absence PHPM | R1306W |
| Cas 16 | J42 | 40 | 49 | 6 | 0.15 | Positif | Absence PHPM | M1304insM |
| Cas 17 | J20 | 35 | 63 | 2 | 0.32 | Positif | Absence PHPM | M1304insM |
| Cas 18 | J0 | 29 | 86 | 39 | 0.45 | Positif | Absence PHPM | M1304insM |

NR: non réalisé; RIPA: ristocetin-induced platelet aggregation; PHPM: protéines de haut poids moléculaire

Figure S1. Evolution du taux plaquettaire médian ($\times 10^9/L$) au cours du 1er mois de vie des enfants mutés *R1341Q* et *R1306W* (A); mutés *V1316M*, *L1460P*, *P1337L* et *M104insM* (B) et les enfants mutés pour *I1309V* (C).



7. ARTICLE ORIGINAL

Neonatal thrombocytopenia revealing type 2B von Willebrand disease: a French cohort of 52 newborns

Ilhem Rahal ¹, Jenny Goudemand ², Remi Favier ³, Claire Berger ⁴, Annie Borel Derlon ⁵, Céline Falaise ¹, Annie Harroche ⁶, Yoann Huguenin ⁷, Cécile Lavenu-Bombléd ⁸, Sandrine Meunier ⁹, Fabrice Monpoux ¹⁰, Valérie Li Thiao Te ¹¹, Marc Trossaert ¹², Fabienne Volot ¹³, Pierre-Emmanuel Morange ¹⁴⁻¹⁵ and Hervé Chambost ¹⁻¹⁵

¹ AP-HM, La Timone Children University Hospital, Center for bleeding disorders, Pediatric Hematology Oncology Department, Marseille, France.

² Lille 2 University Hospital, Center for bleeding disorders, CRMW, Department of Hematology, Lille, France.

³ Assistance Publique -Hôpitaux de Paris, Armand Trousseau Children University Hospital, CRPP, Paris, France.

⁴ Saint-Etienne University Hospital, Center for bleeding disorders, Saint-Etienne, France.

⁵ Côte de Nacre University Hospital, Center for bleeding disorders, Caen, France.

⁶ Assistance Publique -Hôpitaux de Paris, Necker University Hospital, Center for bleeding disorders, Paris, France.

⁷ Bordeaux University Hospital, Center for bleeding disorders, Bordeaux, France.

⁸ Assistance Publique -Hôpitaux de Paris, Bicêtre University Hospital, Center for bleeding disorders, Le Kremlin Bicêtre, France.

⁹ HCL, Lyon University Hospital, Center for bleeding disorders, Lyon, France.

¹⁰ L'Archet University Hospital, Nice, Center for bleeding disorders, Nice France.

¹¹ Amiens University Hospital, Center for bleeding disorders, Amiens, France.

¹² Nantes University Hospital, Center for bleeding disorders, Nantes, France.

¹³ Dijon University Hospital, Center for bleeding disorders, Dijon, France.

¹⁴ AP-HM, La Timone University Hospital, Center for bleeding disorders, Laboratory of Hematology.

¹⁵ Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, NORT, Marseille, France.

ABSTRACT

Type 2B von Willebrand disease is a rare, autosomal-dominant inherited bleeding disorder. Increased affinity of von Willebrand Factor for the platelet receptor GPIIb- α leads to variable thrombocytopenia, increasing the risk of bleeding. Biological diagnosis of this disease may be challenging and thrombocytopenia may be a warning sign.

We collected all the cases of children born in a 10-year period diagnosed with type 2B von Willebrand disease and managed in a center for bleeding disorders of the French network, to focus on neonatal thrombocytopenia. The bleeding phenotype and molecular profile were described in 52 newborns, 18 suffering of thrombocytopenia. Among these 18 cases, 12 had a family history of von Willebrand disease and 9 were symptomatic with mucosal or cutaneous bleedings. Median platelet count was $10.5 \times 10^9/L$ (range, 4-127). Eleven newborns received platelet transfusions or intravenous immunoglobulin infusions; only one received von Willebrand Factor concentrates. Time from birth to diagnosis of VWD was heterogeneous (one day to 36 months) with frequent delayed diagnosis, even in cases with family history.

Various heterozygous mutations in the A1 domain were identified: *R1341Q* (n=4), *V1316M* (n=3), *M1304insM* (n=3), *I1309V* (n=2), *L1460P* (n=2) and *R1306W* (n=2). One patient had homozygous mutation (*P1337L*). The comparison of recovery of platelets count during the first month of life suggests an impact of the genetic profile.

Type 2B VWD is a rare cause of neonatal thrombocytopenia that has to be considered to avoid delayed diagnosis and inadequate treatments. Molecular diagnosis may be helpful for early diagnosis in cases with family history.

INTRODUCTION

VWF is a multimeric glycoprotein (GP) synthesized by endothelial cells and megakaryocytes. Its two main functions consist in primary hemostasis and transport of factor VIII (FVIII) in plasma. Von Willebrand disease (VWD), that is caused by defects in concentration, structure, or function of von Willebrand factor (VWF), stands for the most frequent inherited bleeding disorder^{1,2}. The prevalence is almost 1% worldwide. VWD is heterogeneous because of the very large size of the gene that implies huge variety of type and location of mutations, resulting in various consequences for the synthesis, the clearance and the function of the protein. Moreover, molecular defects can occur in more than one of the functional domains of the multimeric GP. As a consequence, VWD is classified in three primary types: partial (type 1) or complete (type 3) quantitative deficiencies and qualitative variants (type 2)³.

The characterization of VWF defect and classification of VWD subtypes use a panel of biological assays including antigenic level of VWF (VWF:Ag); VWF-platelet GPIb interaction (VWF:RCO); factor VIII procoagulant activity (FVIII:C) and detection of high- and intermediate molecular weight multimers (HMWMs). The classification of VWD may be confirmed by genomic analysis.

Type 2B VWD is a rare autosomal-dominant inherited subtype (5-8% of VWD)⁴. It is characterized by an increased affinity for the platelet receptor GPIIb- α that is usually revealed by aggregation either spontaneously or occurring at low concentrations of ristocetin during a RIPA test (ristocetin-induced platelet aggregation)⁴. Type 2B VWD may be associated to moderate or severe thrombocytopenia⁵. A lack of HMWMs which are the most hemostatic forms may participate to bleeding symptoms.

Four specific mutations (*R1306W*, *R1308C*, *V1316M* and *R1341Q*) represent almost 80% to 90% of type 2B VWD. They result from substitution of amino acids in the A1 domain of VWF gene⁶.

Thrombocytopenia in type 2B VWD can be moderate, severe or absent. It is characterized by morphologic abnormalities on blood smears like the presence of giant platelets and platelets clumps that can make the interpretation of platelets count critical^{7,8}. Thrombocytopenia can be more severe in stressful situations like pregnancy or neonatal period because of the physiological increase of plasmatic VWF level. Federeci et al. reported a cohort of 67 patients with type 2B VWD and 30% of them with thrombocytopenia at baseline. Thrombocytopenia and risk of bleeding were associated with stressful situations such as pregnancy, infection or surgery⁹.

Management of pregnancy and delivery of women with type 2B VWD has been described¹⁰⁻¹⁶ but very few information are available about the prevalence and the impact of thrombocytopenia in newborns. Only seven cases have been reported in the literature and the therapeutic attitude is consequently undefined^{7,12,13,17-19}.

The present observational and retrospective study focused on children born through the last decade and presenting type 2B VWD. Cases were recruited through the French network of centers for bleeding disorders. Our aim was to describe the impact of thrombocytopenia as regards diagnosis and management of type 2B VWD in neonatal period. Moreover, we attempted to compare the phenotypical and molecular profile of children with and without neonatal thrombocytopenia diagnosed for type 2B VWD.

MATERIAL AND METHODS

Clinical assessment

We sent a request to the physicians treating children with hereditary bleeding disorders in all the centers identified through the dedicated French network of centers for rare bleeding disorders.

All the children with type 2B VWD diagnosis and born over the last 10 years (i.e. between January 1st, 2006 and December 31st, 2015), were eligible for the study. Parents or legal guardians of children included in the study were informed about its objectives and modalities and approved their child's enrolment in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Ethics Committee of the French Society of Pediatrics.

In order to check for the exhaustiveness of the data collection from participating centers, we compared our cohort to data from both the French Reference Center for VWD (CRMW) and FranceCoag databases.

Clinical and biological measures

We collected all available comprehensive clinical and biological data during the neonatal period (from birth to day 28 of life). Clinical data included: family history of bleeding disorders, conditions of delivery, obstetrical complications, presence and description of hemorrhagic manifestation at birth, if any. All the platelet counts and platelets morphology analysis on blood smears (presence or absence of aggregates for example) were recorded if assessed during the neonatal period. The patients with platelet count below $150 \times 10^9/L$ were considered as thrombocytopenic. If platelet count was not possible on EDTA tube, the count on citrate tube was also taken into account. The age at diagnosis of type 2B VWD and main reasons for diagnosis were recorded. Were collected the timing and frequency of therapeutics undertaken to treat thrombocytopenia, including platelet transfusions, intravenous immunoglobulin (IVIg) infusions and Willebrand factor infusions. We recorded standard hemostatic measures and all the specific investigations for VWD i.e. VWF:Ag (U/dL), VWF:RCo (U/dL), FVIII:C (U/dL), plasma VWF multimeric distribution, RIPA test and genomic analysis of the VWF A1 domain in the exon 28. The period between documentation of the thrombocytopenia and the first exploration of VWF leading to the diagnosis was also collected.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean, median and range. Comparison between groups was made by Mann-Whitney U test, where appropriate. Statistical analysis was performed using SPSS software package.

RESULTS

Characteristics of the patients

Among 31 centers, 13 reported at least one patient and 18 declared the absence of followed patient, providing a cohort 52 patients diagnosed with type 2B VWD and born during the 10-year study period.

Two cases of this series have already been reported as thrombocytopenic newborns with a combined diagnosis of platelet-type VWD and New-York type 2B VWD²⁰. As thrombocytopenia was not related to VWD in these two cases, they were presented separately from the groups according to the existence of neonatal thrombocytopenia or not.

Eighteen cases (36%) were diagnosed as thrombocytopenic newborns (8 boys and 10 girls). The phenotypic data according to the presence or absence of thrombocytopenia are shown in table 1. Only 12 (67%) of thrombocytopenic newborns had a family history of VWD as compared to 28 (88%) of those without. Bleeding was the most frequent cause of diagnosis in patients with neonatal thrombocytopenia (50%) whereas non thrombocytopenic were diagnosed due to family history in the majority of cases (66%). Cutaneous or mucous signs (petechia or ecchymoses) were the most frequent revealing bleedings (50% and 19% of newborns with and without thrombocytopenia respectively).

Among the 18 thrombocytopenic newborns, the median platelet count was $10.5 \times 10^9/L$ (range, 4-127) with aggregates on blood smears in 10/18 (56%). Only 3 newborn among the fifteen with thrombocytopenia tested for standard hemostasis parameters had abnormal results. The median time for diagnosis of VWD was 36 months (range 1 day; 60 months) with a significant difference between thrombocytopenic and non-thrombocytopenic groups (4.8 vs 24 months; $p < 0.01$)

In almost all cases with neonatal thrombocytopenia, the first diagnosis considered was materno-fetal allo-immunization. Even in cases with arguments in favor of this hypothesis due to incompatibility situation among parental platelet groups, no confirmation was observed. The other more frequently evoked causes were maternal autoimmunity with trans-placental transmission of antiplatelet IgG and central etiology. These hypotheses led to IVIg infusion and/or platelet transfusion in 12 (67%) of the patients (Table 3). Only one patient (case n°1, supplementary data) received VWF concentrates during the first month of life to treat thrombocytopenia.

Phenotypic feature according to genotype for the entire cohort

Nucleotide sequence analysis of DNA fragments of VWF exon 28 was performed in all but two patients. It revealed 15 different heterozygous mutations in the A1 domain.

Table 2 reported the different mutations of the VWF A1 domain according to the presence or absence of thrombocytopenia. Among patients with thrombocytopenia, 7 known mutations²¹⁻²⁵ were found in 17 tested patients: *R1341Q* (n=4), *V1316M* (n=3), *M1304insM* (n=3), *I1309V* (n=2), *L1460P* (n=2), *R1306W* (n=2) and *P1337L* (n=1) (Table 2).

R1341Q mutation was the most frequent in both groups and observed in 17 patients, 4 (8%) and 13 (26%) in the group with or without thrombocytopenia respectively. *R1306W* and *P1337L* mutations were also found in both groups. In one case, thrombocytopenia was associated with a homozygous *P1337L* mutation. *V1316M*, *L1460P*, *I1309V* and *M1304insM* mutation were exclusively observed in patients with neonatal thrombocytopenia. Some mutations were found in patients without neonatal thrombocytopenia only: *R1341W*, *P1266L*, *C1272Y*, *R1306Q*, *H1268G*, *V1279I* and *R1308C*.

Phenotypic feature according to genotype for thrombocytopenic patients

All newborns with *V1316M* and *L1460P* had cutaneous manifestations of thrombocytopenia. Half of cases with *R1341Q* or *R1306W* were symptomatic with varying feature, as shown on Table 3. Of note, newborns with bleedings and *R1341Q* had instrumental delivery (see Table S1). The asymptomatic newborns were explored because of family history or incidentally (see supplementary data).

When performed before day 15 after birth, high VWF:RCo level was observed in 2/6 newborns (*I1309V* mutated newborn). Multimeric pattern of VWF showed the absence of HMWM in all patients when performed (10 children). RIPA test was performed in 12 of the 18 children and revealed agglutination of platelets at low dose of ristocetin in 11. Diagnosis was confirmed by molecular analysis in all but one thrombocytopenic children (case n°7 in which the diagnosis was assessed after RIPA).

The detailed clinical and biological features at birth are detailed for each case according to the genetic mutation in table 3 (presence of cutaneo-mucous bleedings or not; platelet count with or without aggregates on blood smears; VWF:RCo level and VWF: RCo/VWF:Ag ratio; RIPA test; FW multimeric pattern).

Evolution of thrombocytopenia during the neonatal period

Among the 18 patients with thrombocytopenia, 12 had a blood count cells (BCC) at birth and six more before day 4, demonstrating the thrombocytopenia (figure 1): 13 below $20 \times 10^9/L$, one between 20 and $50 \times 10^9/L$, three between 50 and $100 \times 10^9/L$, and one had more than $100 \times 10^9/L$. Explorations of the last case (n°4, see supplementary data) started over day 40. Around days 10 to 15, 11 patients had available data. Six had a platelet count over $50 \times 10^9/L$. Among the five others who presented sustained thrombocytopenia, only case n°14 reached the threshold of $50 \times 10^9/L$ during the first month after birth (supplementary data). This patient

had *R1341Q* mutation. The four other patients had *V1316M* mutation (case n°6 and n°10) and *L1460P* mutation (case n°3 and n°5, supplementary data).

Figure 1 shows the evolution of thrombocytopenia through the first month according to the mutational status. Thrombocytopenia appeared as less severe in cases with *R1341Q* and *R1306W* mutations, with a median platelet count quickly reaching the threshold of $100 \times 10^9/L$ (figure S1A). The patients with *I1309V* mutation reached a median platelet count over $60 \times 10^9/L$ around day 10 to 15 and over $50 \times 10^9/L$ at day 30 (figure S1B). Newborns with *V1316M*, *L1460P*, *P1337L* and *M1304insM* did not reach the threshold of $50 \times 10^9/L$ during the 30 first days (figure S1C).

DISCUSSION

The gain-of-function of VWF type 2B VWD confers an increased affinity for platelet surface GPIb- α ^{8,26,27}. The neonatal period, which is stressful and critical for newborns, may facilitate thrombocytopenia in 2B VWD due to enhanced amount of circulating VWF. Only seven cases of thrombocytopenia in neonates with 2B VWD were published until now^{7,12,13,17-19}. To our knowledge, the present study of 52 neonates that aimed to evaluate the incidence of neonatal thrombocytopenia due to type 2B VWD, is the first national cohort and the largest series of very young children with 2B VWD reported in the literature.

We observed 36% of newborns with neonatal thrombocytopenia. This result appears comparable to the frequency observed at baseline (30 to 40%) in a cohort of 67 older patients (mean age 42 years; [6-87]) reported by Federici⁹. After stressful situations such as infection, surgery or pregnancy, thrombocytopenia almost doubled and was associated with a higher risk of bleeding. It can be argued that our study underestimates the frequency of neonatal thrombocytopenia since most of the 32 non thrombocytopenic children did not benefit from a BCC at birth. This hypothesis is reinforced by the fact that some patients may be totally asymptomatic as it was observed in half thrombocytopenic cases in our series.

A wide degree of heterogeneity can be observed in the phenotype and the biological profile among the cases, even within a family^{13,28,29}. As expected, in the present cohort of patients with neonatal thrombocytopenia, the most frequent clinical signs were cutaneous or mucous bleedings (62% of cases), but also cephalhematoma that characterizes bleedings due to the obstetrical trauma. No serious intracranial hemorrhage was reported, even in instrumental vaginal delivery, which may suggest different hemostatic conditions by comparison with newborns with hemophilia³⁰. Serious bleeding occurred in one newborn (hemorrhagic shock in case n°10).

Patients without documented neonatal thrombocytopenia were diagnosed for type 2B VWD around the age of 2 years. They all had a normal platelet count at diagnosis and they did not experience further thrombocytopenia during surgery or any other stressful situation. No warning event at birth was reported in this group.

Surprisingly, even in cases with neonatal thrombocytopenia, the family history of VWD (13 cases; 72%) was taken into account at birth only in 7 cases (54%). Unfortunately, the remaining 6 cases suffered from bleeding symptoms, underwent inappropriate investigations, inefficient and potentially damaging therapeutics. In cases with family history and thrombocytopenia, type 2B VWD should be considered as the most probable diagnosis, requiring urgent diagnosis assessment for appropriate treatment.

The time for diagnosis of bleeding disorder is heterogeneous between 1 day and 36 months. The delayed diagnoses may represent a real loss of chance for adequate treatment as observed in case n°10. Moreover, chronic thrombocytopenia without established diagnosis led to unnecessary and invasive investigations like bone marrow aspiration.

The clinical and biological diagnosis assessment of VWD is not easy. Due to the lack of sensitivity of VWF:RCo that stands for the first line screening test for VWD, laboratory tests deserves to be repeated in the neonatal period. Indeed, the biological diagnosis in neonates is challenging due to the enhanced concentration of circulating VWF. So far, a normal rate of VWF:Ag and VWF:RCo at this period cannot exclude the diagnosis.

The presence of aggregates observed in 56% of cases, underlines that careful examination of the blood smears may be very useful for the diagnosis. The observation of platelet counts over $50 \times 10^9/L$ between the first and third month suggests that easier interpretation of biological results after the first trimester of life deserve to repeat laboratory tests at this moment. Management of the diagnosis of thrombocytopenia in the absence of known family history of bleeding disorder should systematically include hemostasis and maybe for the most critical cases, specific VWF exploration. In fact, we propose to test PFA-100 first if platelet count is over $50 \times 10^9/L$ and then, to test RIPA if platelet count remains over $50 \times 10^9/L$. In critical situations with platelets below $50 \times 10^9/L$, genetic analysis and/or parental hemostatic analyses may be helpful to reinforce the hypothesis of type 2B VWD. Of course, some other diagnoses should be first explored like allo- or auto-immune thrombocytopenia that stands for the more frequent one. In case of family history of type 2B VWD, a platelet count with blood smear analysis should be systematically performed for the newborn in order to check the presence or not of thrombocytopenia and for aggregates.

It is noteworthy that a mutation was identified in all the investigated cases (17/18). These results allowed a comparison of clinical phenotype and platelet count outcome according to the genetic status. It has already been reported that some mutational status may carry differential risks for hemorrhagic status and thrombocytopenia^{10,14,16}. Two children with type 2B VWD New York (*P1266L*) and thrombocytopenia were excluded from the analyses and comparisons due to their status of double heterozygosis with a combined mutation for platelet-type VWD (*T1034del*)²⁰. Due to this status, we did not observe the normal platelet count that could have been expected in type 2B VWD New York.

Federici *et al* showed that bleeding severity score was inversely related to platelet count at baseline and even more during stress⁹. Patients with *V1316M* mutation had very high bleeding score and the lowest platelet count after stress ($< 50 \times 10^9/L$). Whereas those with *I1309V*, *R1306W* or *R1341Q* mutations had a moderate bleeding score but presented moderate

thrombocytopenia between 50 and $100 \times 10^9/L$ and over $100 \times 10^9/L$ after stress-induced. Our results correlate with these findings and extend them to a specific cohort of newborns. Indeed patients with *V1316M* mutation were the most severe cases in our series, particularly for case n°10. Patients with *V1316M* and *L1460P* mutations were the most transfused during neonatal period, assessing severe and recurrent thrombocytopenia. Patients with *R1341Q* mutation seemed to be revealed after traumatic manipulation. Even if thrombocytopenia was profound for neonates with *R1341Q*, *I1309V* and *M1304insM*, they did not experienced any spontaneous hemorrhage.

We defined three groups in our cohort with different evolution of thrombocytopenia during the first month after birth according to their mutational status: very severe thrombocytopenia below $50 \times 10^9/L$ for *V1316M*, *L1460P*, *P1337L* and *M1304insM* mutations; severe thrombocytopenia between 50 and $100 \times 10^9/L$ for *I1309V* mutation and moderate thrombocytopenia over $100 \times 10^9/L$ for patients with *R1341Q* and *R1306W* mutations. These observations are limited by the little number of patients. But, a strength of our cohort is that it is representative of a whole national population born in a 10 year period and diagnosed for type 2B VWD. This description confirms the existence of a correlation between the phenotype and molecular profile in patients investigated at birth that stands for a stressful situation. Moreover the comparison of the outcome within these groups suggests a correlation of the genetic status with the capacity and kinetic of recovery of platelet count.

In conclusion, our study of 52 pediatric cases with type 2B VWD, including 18 cases with neonatal thrombocytopenia, represents the unique series reported to our knowledge. We tried to collect all the cases of children born in a 10-year period in France. The absence of request in the whole period as regards the subtype of VWD in FranceCoag, the national registry for hereditary bleeding disorders, did not permit to use this database as the main source of information³¹. The number of 52 declared cases suggests a high informative level of this series. It could be argued that few centers declared cases (13 out of 31), but the information transmitted by centers fits with the expected data from the national databases, assessing a suitable representativeness of our series.

In some cases serious hemorrhagic complications are observed but diagnosis of 2B VWD may be delayed despite of neonatal thrombocytopenia. The frequency of neonatal cases with documented thrombocytopenia (35%) stresses the relevance of this issue. Moreover we cannot exclude that some children without neonatal thrombocytopenia were not detected at birth. Our study may be helpful to elaborate recommendation for the management of the neonatal period of type 2B VWD patients. Autosomal dominant transmission should be taken into account with a neonatal screening. As it has been reported that thrombocytopenia in type 2B VWD is an independent risk factor for bleeding, we propose a systematic neonatal platelet count and careful analysis of blood smears in case of parental history, in order to check the existence and to treat the thrombocytopenia, if appropriate.

The biological diagnosis with specific analysis of hemostasis may be critical, but it should always be at least evoked and investigated. Misdiagnosis may induce unnecessary invasive investigations and/or inappropriate treatments, and carry a loss of chance of treatment in case

of threatening hemorrhages. The lack of consideration of family history has to be stressed in our series. Due to the technical difficulties and lack of sensitivity of usual diagnosis tests for VWD 2B (VWF:RCo and RIPA test), molecular analysis should be considered early, at least for screening in cases with family history.

Acknowledgments

The authors thank all the physicians who participated to the survey and also to the CRMW and FranceCoag Coordinating teams who permitted to assess the exhaustiveness of this national study.

Centers and physicians with at least one declared case: CHU Amiens (V Li Thao TE), CHU Bordeaux (Y Huguenin), CHU Caen (A Borel Derlon), CHU Dijon (F Volot), CHRU Lille (J Goudemand, S Susen, B Wibault), HCL Lyon (S Meunier, C. Negrier), AP-HM Marseille (H Chambost, C Falaise, PE Morange), CHU Montpellier (C Biron Andreani, JF Schved), CHU Nantes (M Sigaud-Ficks, M Trossaert), Hôpital de Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre (T Lambert, C Lavenue Bombled), Hôpital Necker, AP-HP, Paris, (A Harroche, A Rafowicz, C Rothschild), Hôpital Trousseau, AP-HP, Paris (R Favier), CHU Saint-Etienne (C Berger)

Centers and physicians with no declared case: CHU Besançon (MA Bertrand), CHU Brest (B Pan Petesch), CH Chambéry (V Gay), CH Le Chesnay (E de Raucourt, A Rafowicz), CHU Clermont-Ferrand (P Gembara, E Dore), CHU Grenoble (D Adjaoud), CHU Limoges (C Oudot), CHU Montmorency (A Hassoun), CHU Nancy (B Frotscher), CHU Nice (F Monpoux), CHU Poitiers (E Benz Lemoine), CHU Reims (P Nguyen, M Munzer), CHU Rennes (S Bayart), CHU la Réunion (P Nyombe, S Samperiz), CHU Rouen (P Schneider), CHU Strasbourg (P Lutz), CHU Toulouse (S Claeysens), CHU Tours (Y Gruel)

8. REFERENCES

1. Castaman G, Federici AB, Rodeghiero F, Mannucci PM. Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. *Haematologica*. 2003;88(1):94–108.
2. Veyradier A, Boisseau P, Fressinaud E, et al. A Laboratory Phenotype/Genotype Correlation of 1167 French Patients From 670 Families With von Willebrand Disease: A New Epidemiologic Picture. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(11):e3038.
3. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCJ, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2006;4(10):2103–2114.
4. Ruggeri ZM, Pareti FI, Mannucci PM, Ciavarella N, Zimmerman TS. Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. *N. Engl. J. Med.* 1980;302(19):1047–1051.
5. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2003;1(7):1335–1342.
6. Cooney KA, Nichols WC, Bruck ME, et al. The molecular defect in type IIB von Willebrand disease. Identification of four potential missense mutations within the putative GpIb binding domain. *J. Clin. Invest.* 1991;87(4):1227–1233.
7. Saba HI, Saba SR, Dent J, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Type IIB Tampa: a variant of von Willebrand disease with chronic thrombocytopenia, circulating platelet aggregates, and spontaneous platelet aggregation. *Blood*. 1985;66(2):282–286.
8. Loffredo G, Baronciani L, Noris P, et al. von Willebrand disease type 2B must be always considered in the differential diagnosis of genetic thrombocytopenias with giant platelets. *Platelets*. 2006;17(3):149–152.
9. 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.
10. Biguzzi E, Siboni SM, Ossola MW, et al. Management of pregnancy in type 2B von Willebrand disease: case report and literature review. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 2015;21(1):e98-103.
11. Rick ME, Williams SB, Sacher RA, McKeown LP. Thrombocytopenia associated with pregnancy in a patient with type IIB von Willebrand's disease. *Blood*. 1987;69(3):786–789.
12. Burlingame J, McGaraghan A, Kilpatrick S, et al. Maternal and fetal outcomes in pregnancies affected by von Willebrand disease type 2. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2001;184(2):229–230.
13. Mathew P, Greist A, Maahs JA, Lichtenberg EC, Shapiro AD. Type 2B vWD: the varied clinical manifestations in two kindreds. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 2003;9(1):137–144.
14. Hepner DL, Tsen LC. Severe thrombocytopenia, type 2B von Willebrand disease and pregnancy. *Anesthesiology*. 2004;101(6):1465–1467.
15. Ranger A, Manning RA, Lyall H, Laffan MA, Millar CM. Pregnancy in type 2B VWD: a case series. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 2012;18(3):406–412.
16. De Wee EM, Knol HM, Mauser-Bunschoten EP, et al. Gynaecological and obstetric bleeding in moderate and severe von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* 2011;106(5):885–892.
17. Proud L, Ritchey AK. Management of type 2b von Willebrand disease in the neonatal period. *Pediatr. Blood Cancer*. 2017;64(1):103–105.
18. Hatta K, Kunishima S, Suganuma H, et al. A family having type 2B von Willebrand disease with a novel

VWF p.R1308S mutation: Detection of characteristic platelet aggregates on peripheral blood smears as the key aspect of diagnosis. *Thromb. Res.* 2015;136(4):813–817.

19. Penel-Page M, Meunier S, Fretigny M, et al. Differential diagnosis of neonatal alloimmune thrombocytopenia: Type 2B von Willebrand disease. *Platelets.* 2017:1–4.

20. Lavenu-Bombled C, Guitton C, Dupuis A, et al. A novel platelet-type von Willebrand disease mutation (GP1BA p.Met255Ile) associated with type 2B “Malmö/New York” von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* 2016;116(6):1070–1078.

21. Randi AM, Jorieux S, Tuley EA, Mazurier C, Sadler JE. Recombinant von Willebrand factor Arg578-->Gln. A type IIB von Willebrand disease mutation affects binding to glycoprotein Ib but not to collagen or heparin. *J. Biol. Chem.* 1992;267(29):21187–21192.

22. Hilbert L, Gaucher C, Mazurier C. Effects of different amino-acid substitutions in the leucine 694-proline 708 segment of recombinant von Willebrand factor. *Br. J. Haematol.* 1995;91(4):983–990.

23. Christophe O, Ribba AS, Baruch D, et al. Influence of mutations and size of multimers in type II von Willebrand disease upon the function of von Willebrand factor. *Blood.* 1994;83(12):3553–3561.

24. Federici AB, Mannucci PM, Stabile F, et al. A type 2b von Willebrand disease mutation (Ile546-->Val) associated with an unusual phenotype. *Thromb. Haemost.* 1997;78(3):1132–1137.

25. Cooney KA, Lyons SE, Ginsburg D. Functional analysis of a type IIB von Willebrand disease missense mutation: increased binding of large von Willebrand factor multimers to platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992;89(7):2869–2872.

26. Randi AM, Rabinowitz I, Mancuso DJ, Mannucci PM, Sadler JE. Molecular basis of von Willebrand disease type IIB. Candidate mutations cluster in one disulfide loop between proposed platelet glycoprotein Ib binding sequences. *J. Clin. Invest.* 1991;87(4):1220–1226.

27. Cooney KA, Ginsburg D. Comparative analysis of type 2b von Willebrand disease mutations: implications for the mechanism of von Willebrand factor binding to platelets. *Blood.* 1996;87(6):2322–2328.

28. Federici AB, Mannucci PM, Bader R, Lombardi R, Lattuada A. Heterogeneity in type IIB von Willebrand disease: two unrelated cases with no family history and mild abnormalities of ristocetin-induced interaction between von Willebrand factor and platelets. *Am. J. Hematol.* 1986;23(4):381–390.

29. Rendal E, Penas N, Larrabeiti B, et al. Type 2B von Willebrand’s disease due to Val1316Met mutation. Heterogeneity in the same sibship. *Ann. Hematol.* 2001;80(6):354–360.

30. Ljung R, Lindgren AC, Petrini P, Tengborn L. Normal vaginal delivery is to be recommended for haemophilia carrier gravidae. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992. 1994;83(6):609–611.

31. Chambost H, Suzan F, pour le Réseau FranceCoag. [Epidemiology of hereditary bleeding disorders: input of FranceCoag Network]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* 2010;17(6):618–619.

9. TABLES AND FIGURES

Table 1. Characteristics of the patients for the entire cohort.

| | Patients with neonatal thrombocytopenia | Patients without neonatal thrombocytopenia* |
|--|---|---|
| Number | 18 | 32 |
| Gender (Male/Female) | 8/10 | 17/15 |
| 2B VWD Family history | 60% | 88% |
| Age at diagnosis (months) | 4.8 | 24 |
| Median (Range) | (0-36) | (0-60) |
| Cause of diagnosis | | |
| - Family history | 7 | 21 |
| - Fortuitous | 2 | 5 |
| - Cutaneous bleeding (serious bleeding) | 9 (1) | 6 (1) |

*Among the 32 patients without documented thrombocytopenia, all had at least one BCC with normal platelets. Two newborns were excluded: they had neonatal thrombocytopenia and were diagnosed for New York type 2B VWD and platelet-type VWD.

Table 2. Mutational status for the entire cohort

| | Patients with neonatal thrombocytopenia (N) | Patients without neonatal thrombocytopenia (N) | All (N) |
|------------------|---|--|---------|
| <i>R1341Q</i> | 4 | 13 | 17 |
| <i>R1306W</i> | 2 | 2 | 4 |
| <i>I1309V</i> | 2 | 0 | 2 |
| <i>V1316M</i> | 3 | 0 | 3 |
| <i>L1460P</i> | 2 | 0 | 2 |
| <i>P1337L</i> | 1 | 2 | 3 |
| <i>M1304insM</i> | 3 | 0 | 3 |
| Not Done | 1 | 1 | 2 |
| Other | 0 | 16* | 16* |
| Total | 18 | 34 | 52 |

* *P1266L* (n=4); *P1266L* and *T1034del* (n=3); *R1341W* (n=3); *C1272Y* (n=2); *R1306Q* (n=2); *V1279I* (n=2); *H1268G* (n=2); *R1308C* (n=1)

Table 3. Phenotype and mutation profile of newborns with neonatal thrombocytopenia

| Mutation | Case (n°) | Bleeding type | First platelet count (x10⁹/L) | Aggregates | VWF:RCo, U/dL | VWF Rco/Ag, ratio | RIPA test | Multimeric pattern |
|------------------|------------------|------------------------------|---|-------------------|----------------------|--------------------------|------------------|---------------------------|
| R1341Q | Case 2 | Cutaneous-mucous | 95 | No | 54 | 0.6 | ND | ND |
| | Case 8 | Cutaneous-mucous | 10 | No | 19 | 0.56 | Positive | No HMWM |
| | Case 9 | - | 90 | No | 18 | 0.42 | Positive | No HMWM |
| | Case 14 | - | 11 | Yes | <7 | 0.14 | ND | No HMWM |
| R1306W | Case 1 | Cutaneous | 13 | Yes | 42 | 0.43 | Positive | ND |
| | Case 15 | - | 19 | Yes | <13 | 0.32 | Positive | No HMWM |
| I1309V | Case 12 | - | 20 | No | 146 | - | Positive | ND |
| | Case 13 | - | 127 | No | 137 | 0.92 | ND | ND |
| V1316M | Case 4 | Cutaneous | 10 | Yes | 10 | 0.3 | ND | No HMWM |
| | Case 6 | Cutaneous | 6 | Yes | 15 | 0.38 | Positive | No HMWM |
| | Case 10 | Cutaneous, hemorrhagic shock | 21 | No | 10 | 0.32 | Positive | No HMWM |
| L1460P | Case 3 | Cutaneous | 7 | Yes | 8 | 0.08 | Negative | ND |
| | Case 5 | Cutaneous | 8 | Yes | 10 | 0.3 | ND | ND |
| M1304insM | Case 16 | - | 19 | Yes | <13 | 0.32 | Positive | No HMWM |
| | Case 17 | - | 5 | Yes | 6 | 0.15 | Positive | No HMWM |
| | Case 18 | - | 4 | Yes | 2 | 0.32 | Positive | No HMWM |
| P1337L | Case 11 | Cutaneous | 5 | Yes | <7 | 0.14 | ND | No HMWM |
| Not Done | Case 7 | - | 9 | Yes | 26 | 0.48 | Positive | ND |

ND: not done; RIPA: ristocetin-induced platelet aggregation; HMWM: high molecular weight multimers

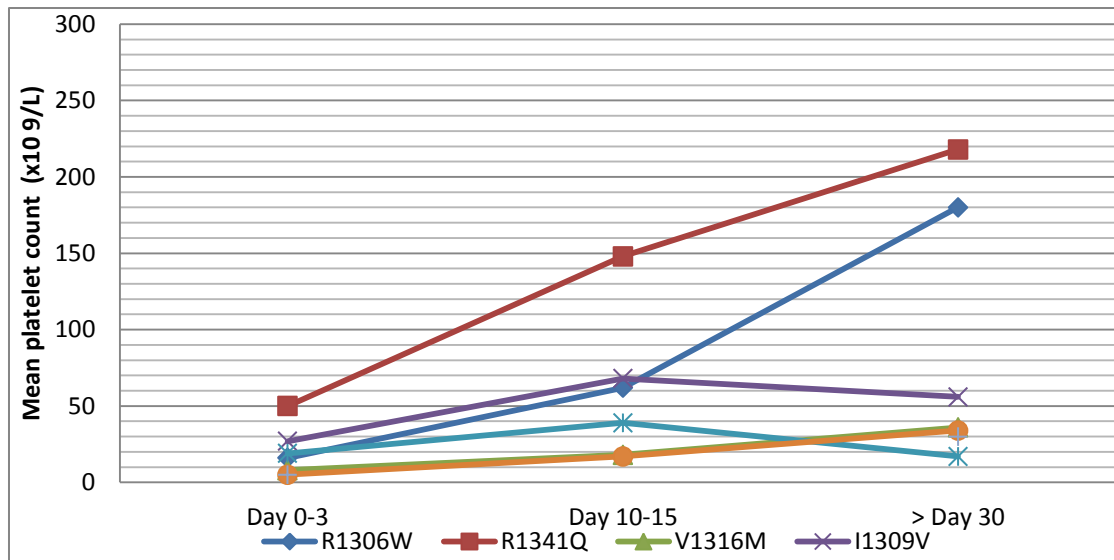


Figure 1. Evolution of thrombocytopenia during the first month after birth according to the mutational status.

Patients with mutation *R1341Q* were cases n°2, 8, 9 and 14; those with mutation *V1316M* were cases n°4, 6 and 10; cases n° 12 and 13 had *I1309V* mutation; case n°1 and 15 had mutation *R1306W*; cases n°3 and 5 had mutation *L1460P*; cases n°16, 17 and 18 had *M1304insM* mutation and case n°11 had mutation *P1337L*. Three subgroups can be individualized. The first one in which the threshold of 100 G/L of platelets is reached during the first month (*R1341Q* and *R1306W* patients); the second one that reached the threshold of 50 G/L during the first month (*I1309V* patients) and the third group which does not reach the threshold of 50 G/L of platelets (*V1316M*, *L1460P*, *P1337L* and *M1304insM* patients)

10.SUPPLEMENTAL DATA

10.1. *Supplemental Results*

Case n°1. A little girl was delivered at term. Her brother and father had been diagnosed for unclassified type 2 VWD. At birth, her body was covered of isolated petechia. Basic laboratory findings showed isolated thrombocytopenia at 13 G/L, with aggregates, and normal PTT. Immunohematological assays shows following results: negative coombs, incompatibility for human platelet antigen (HPA)-1a, -5b and -15b between the child and her mother without identification of antibody. A platelet transfusion and an IVIg infusion were administered. A bone marrow aspiration was performed because of a refractory thrombocytopenia to treatment and did not found any central etiology. As her father indicated his own bleeding disorder, laboratory assays of VWF were performed and showed: FVIII/C 61 U/dL, VWF:Ag 97 U/dL, VWF:RCo 42 U/dL and VWF:RCo/Ag 0.43 in favour of type 2 VWD. Replacement therapy with VWF (Wilstart® LFB first, and then Wilfactin® LFB) was administered combined with platelet transfusions and IVIg infusions. On day 46, RIPA test showed agglutination of platelets at low dose of ristocetin (0.5 mg/ml). Nucleotide sequence analysis of DNA fragments of VWF exon 28 revealed heterozygous mutation on the domain A1 (*R1306W*).

Case n°2 was born at term from in vitro fertilization. The delivery was surrounded by an infusion of VWF (Wilfactin®, LFB) due to the thrombocytopenia observed during the pregnancy of her mother, known as affected by VWD. Haemorrhagic shock on episiotomy and thrombocytopenia required the transfer of the mother to intensive unit care. The newborn presented a cephalhematoma and minim haemorrhagic conjunctivitis. Blood cell count (BCC) revealed isolated thrombocytopenia at 95 G/L without aggregate. Normal count of platelets recovered spontaneously in a few days. No specific treatment was administered. The molecular diagnosis of type 2B VWD was assessed 5 months later with VWF:Ag 90 U/dL, VWF:RCo 54 U/dL, VWF:RCo/Ag ratio at 0.6. RIPA had not been performed.

Case n°3. A little girl delivered at term without any obstetrical complication presented at birth isolated petechia all over her body. The platelet count revealed deep thrombocytopenia (7 G/L) with aggregates but no anaemia. She received iterative platelet transfusions and IVIg infusions. Incompatibility for human platelet antigen (HPA)-1a and -15b was evocated but no antibody had been isolated. Platelet transfusions from the mother were administered because of a non-response to the first treatment without success. At day 13, the exploration of VWF showed the following results: FVIII/C 90 U/dL, VWF:Ag 105 U/dL, VWF:RCo 8 U/dL and VWF:RCo/Ag 0.08 in favour for type 2 VWD. RIPA test was not performed. No specific treatment had been delivered. Nucleotide sequence analysis of DNA fragments of VWF exon 28 revealed heterozygous mutation on the domain A1 (*L1460P*).

Case n°4 presented minimal bleedings around three months after his birth, with a first epistaxis concomitant of a gastroenteritis. The BCC revealed thrombocytopenia ($36 \times 10^9/L$)

with aggregates on the smears and anaemia. The haemostasis analysis was normal except a PTT at 1.4. The investigations did not reveal schizocytes, alloimmunisation, immunodeficiency or auto-immunity. Bone marrow aspiration showed a normal activity of haematopoiesis. A perfusion of IVIg was administered. A few days later, a second episode of bleeding (epistaxis and petechia) appeared. Thrombocytopenia was persistent at 55 G/L. A second cure of IVIg was delivered. His grandmother noted that she observed the same cutaneous lesions (petechia) when he was born but no analysis was done. So far, exploration of haemostasis disorders was performed and finally revealed normal TP, PTT, FIX, FXI and fibrinogen; FVIII:C 45 U/dL, VWF:Ag 34 U/dL, VWF:RCo 10 U/dL and ratio VWF:RCo/Ag 0.3. He was referred to a specialist who documented type 2B VWD by nucleotide sequencing analysis of DNA (*V1316M*).

Case n°5 presented icterus at day 3 after birth. BCC revealed isolated profound thrombocytopenia at $8 \times 10^9/L$ with aggregates. Transfontanellar echography revealed a little bleeding in choroid plexus but without neurologic impact. Eye fundus showed micro-bleedings. Platelet transfusions were realized and also IVIg infusion. Platelet count improved around day 7 ($95 \times 10^9/L$). At day 12, she had blood transfusion because of anaemia at 9 g/dL. No maternofetal incompatibility was found. Megakaryocytes were normally present on bone marrow aspiration. Later after, she still benefited of platelet transfusions because of gingivorragies and once again blood transfusion for anaemia. At the age of 15 months, willebrand disease was explored and revealed: FVIII:C 52 U/dL, VWF:Ag 27 U/dL, VWF:RCo 10 U/dL and ratio VWF:RCo/Ag 0.37. RIPA test and multimeric pattern were not performed.

Case n°6 was also covered of petechia at birth without any other abnormality at clinical examination. BCC revealed severe thrombocytopenia ($6 \times 10^9/L$) with aggregates even on citrate tube and normal morphology of platelets. The hemostasis parameters were normal and there were no inflammatory syndrome. Platelet transfusions and IVIg infusion were administrated in order to improve platelet count. The thrombocytopenia relapsed at $17 \times 10^9/L$ still with aggregates and it was accompanied by petechia. As the thrombocytopenia was dependant of transfusions it was associated to IVIg infusion. The hypothesis of maternofetal alloimmunisation was not confirmed (no antibody individualized). At day 138, exploration of persistent thrombocytopenia revealed biological arguments for type 2B VWD.

Case n°7. A newborn boy delivered normally had a paternal familial history of type 2B VWD. At first clinical examination, he did not present any physical sign of bleeding disorder. Blood analysis was performed at day two and revealed isolated severe thrombocytopenia with aggregates. The result was confirmed on citrate tube. Haemostasis analysis found a normal PTT and PT and also a VWF:RCo ratio at 90 U/dL. The little boy received platelet transfusion and IVIg infusion for a hypothetic diagnosis of maternofetal incompatibility that was not confirmed. At least, the platelet count got normalized after treatment during fifteen days. At day 16, the platelet count fell down and a new platelet transfusion and IVIg infusion was delivered. Four months later, a new exploration of VWF was in favour of type 2 VWD with FVIII: C, VWF:Ag, VWF:RCo and VWF:RCo/Ag, at 30 U/dL, 54 U/dL, 26 U/dL and 0.30, respectively. No specific analysis for the diagnosis of VWD2B was performed.

Case n°8 had ecchymosis on her left arm attributed to obstetrical conditions. On day 2, severe isolated thrombocytopenia ($10 \times 10^9/L$) was identified consecutively to the occurrence of petechia on her head and icterus. Transfontanellar echography was normal. The hypotheses of auto- or alloimmune thrombocytopenia were on the first plan. Severe isolated thrombocytopenia ($10 \times 10^9/L$) was found on day 2, IVIg perfusions and platelet transfusion were followed by platelet count and clinical recovery. So far, the hypothesis of auto-immune thrombocytopenia was retained because of the finding of antibodies in the mother's blood analysis. Thirty-six months later, chronic thrombocytopenia was explored: normal PT, PTT and fibrinogen was found but a prolonged PFA-100. Arguments for type 2B VWD were found with: FVIII:C 55 U/dL, VWF:Ag 34 U/dL, VWF:RCo 19 U/dL and VWF:RCo/Ag ratio at 0.56. HMWMs were absent. RIPA test induced aggregation at low dose of ristocetine (0.2 -0.5 mg/ml).

Case n°9 had a blood cell count at birth because of familial history and revealed isolated moderate thrombocytopenia at $80 \times 10^9/L$. In the hypothesis of maternofetal alloimmunisation, platelet transfusion and infusions of IVIg were administrated. Normalization of platelet count was obtained but the hypothesis was not confirmed. At day 16, exploration of VWD showed a VWF:Ag at 148 U/dL and VWF:RCo at 138 U/dL. So far, the hypothesis of type 2B VWD was also discarded. Later, at the age of 29 months, he was explored again because of the family history and this neonatal thrombocytopenia. The platelet count was normal at $215 \times 10^9/L$, TCA 1.35, PT 87%, fibrinogen 4.4 mg/l, FVIII:C 44 U/dL, VWF:Ag 35 U/dL, VWF:RCo 17 U/dL and VWF:RCo/Ag 0.49. HMWMs were absent. RIPA induced aggregation at low dose of ristocetine.

Case n°10 was covered of petechia at birth. The first analysis revealed isolated severe thrombocytopenia ($10 \times 10^9/L$). On day 1, she presented hypotension, coma, no fever but still diffuse petechia. Three volemic expansion, blood, platelet and plasma transfusion were performed and large antibiotherapy was administrated. Haemorrhagic shock was the first hypothesis because of an hemocue at 4 g/dl. BCC confirmed anemia and platelet count was at $10 \times 10^9/L$. Blood hemostasis parameters were normal. Abdominal imaging showed peritoneal effusion, a large subcapsular hepatic haematoma and right surrenal haematoma. Transfontanellar echography was normal but the fundus revealed bilateral diffuse haemorrhage. The plasma α FP dosage was normal. Bacteriologic analysis documented isolated escherichia coli in gastric fluid.

Case n°11. Consanguineous couple did not have known bleeding disorder. During pregnancy, the mother presented at 21 weeks of amenorrhea moderate thrombocytopenia at $133 \times 10^9/L$. Delivery happened normally at term without any hemorrhagic complication. A blood analysis of the newborn was performed and revealed severe thrombocytopenia at $5 \times 10^9/L$ with platelet clumps. He had few petechia. Blood haemostasis parameters were normal. Platelet transfusion and IVIg were administered. The hypothesis of maternofetal alloimmunisation was not confirmed (no antibody individualized). Allo- and auto-antibodies of the mother and child were negative. So was the cross-match between mother and father serum. A bone marrow aspiration excluded the hypothesis of a central cause of thrombocytopenia. Thirteen months later, new explorations revealed bleeding disorder for the little girl and her parents

with low VWF:RCo for all of them (FVIII:C 28 U/dL, VWF:Ag 40 U/dL, VWF:RCo 7 U/dL and VWF:RCo/Ag 0.14). The distribution of VWF multimers and the molecular analysis for the all the members are not available yet. RIPA test couldn't be performed. Nucleotide sequence analysis of DNA fragments of VWF exon 28 revealed homozygous mutation *P1337L*. Parents were both heterozygous for both mutations but didn't ever have any haemorrhagic clinical sign.

The case n°12 suffered of intra-uterine growth retardation but was finally normally delivered at 36 weeks of amenorrhea. Because of IUGR, analysis were done at day 3 of life and revealed severe thrombocytopenia at $20 \times 10^9/L$. The VWF:RCo was high on day 3 and no incompatibility was found between the child and his mother. Platelet transfusions and IVIg were administered with a low effect on platelet count. No diagnosis was established and platelet count was still checked every week during two months. Later, at the age of sixteen months, exploration of VWD confirmed the diagnosis. His brother, case n°13, was born four years later. Blood analysis at birth (because of the family history) showed moderate thrombocytopenia at $127 \times 10^9/L$, normal PT and PTT, VWF:RCo at 137 U/dL and VWF:Ag at 149 U/dL. The hypothesis of VWD2B disease could not be excluded. A platelet transfusion was administered at day 3 because of a low platelet count. So far, the platelet count was above $50 \times 10^9/L$ during the first month. Eighteen months later, the diagnosis of type 2B VWD was confirmed.

Case n°14. A little boy was delivered by caesarean at 38 weeks of amenorrhea. His mother had thrombocytopenia revealed during pregnancy and treated by corticosteroid. At birth, he presented transitory respiratory distress without any clinical sign of bleeding. A platelet count was performed because of maternal history and showed thrombocytopenia at $11 \times 10^9/L$. Giant platelets were observed on blood smear. Platelet transfusions and IVIg infusions were administered in order to correct cytopenia on day 0, day 5 and day 10 but without effect. Arguments in favour of materno-foetal allo-immunisation were not confirmed. On day 9, VWD exploration showed a FVIII:C, VWF:Ag, VWF:RCo and VWF RCo/Ag at 129 U/dL, 156 U/dL, 106 U/dL and 0.68, respectively. Thrombocytopenia remained under the threshold of $50 \times 10^9/L$ until day 35 and over the threshold of $100 \times 10^9/L$ over day 56. At the age of 7 months, new explorations revealed: PFA-100 over 200 (with epinephrine and ADP) and FVIII:C, VWF:Ag, VWF:RCo and VWF RCo/Ag at 35 U/dL, 11 U/dL, 27 U/dL and 0.41, respectively. RIPA test induced aggregation at low dose of ristocetine (0.5 mg/ml). Diagnosis of type 2B VWD was confirmed by molecular analysis revealing R1341Q mutation.

Case n°15 was delivered without any complication. His mother and sister were diagnosed for type 2B VWD. For this reason, a blood sample was realized at birth and revealed thrombocytopenia with aggregates at $19 \times 10^9/L$. The haemostasis analysis was normal and willebrand analysis revealed FVIII:C 17 U/dL, VWF:Ag 41 U/dL, VWF:RCo 13 U/dL and VWF:RCo/Ag 0.32. Multimeric pattern showed the absence of high and intermediate molecular weight multimers and RIPA test revealed agglutination of platelets at low dose of ristocetine. Nucleotide sequence analysis of DNA fragments of VWF exon 28 revealed two heterozygous mutations on the domain A1: *R1306W* and *D1472H*.

Case n°16 and n°17 are brother and sister. They were delivered without any complication. None of them had any clinical sign of bleeding at birth. They had a family history of type 2B VWD. At birth, they both had a BCC that revealed thrombocytopenia at $19 \times 10^9/L$ (case n°16) and $5 \times 10^9/L$ (case n°17). No supportive or specific treatment was administered in absence of haemorrhage. Platelet count was more closely followed for case n°16 because he was the first child. Thrombocytopenia remained under the threshold of $50 \times 10^9/L$ during two months after birth. Biological parameters performed later (one to two months after birth) were in favour of type 2 VWD. RIPA test, multimeric pattern and molecular analysis confirmed the diagnosis of type 2B VWD.

Case n°18 is the cousin of case n°16 and 17. His mother was diagnosed for type 2B VWD with chronic thrombocytopenia. He was delivered by caesarean but did not present any clinical sign at birth. A BCC was done at birth and showed a platelet count at $4 \times 10^9/L$. Also, vWF explorations at birth showed FVIII:C at 29 U/dL, VWF:Ag at 85 U/dL, VWF:RCo at 86 U/dL and VWF RCo/Ag at 0.45. No other diagnosis was evocated or explored. One year after, complement of analysis confirmed the diagnosis of type 2B VWD with a RIPA test showing aggregation at low doses of ristocetine, a multimeric pattern with lack of HMWMs and M1304insM mutation.

10.2. Supplemental tables and figures

Table S1. Characteristics of the patients, obstetrical conditions, neonatal phenotype and initial treatment

| Family cases | Delivery | Type of bleeding | First platelets count ($\times 10^9/L$) | Aggregates | Platelet's morphology | Platelet transfusions (n) | IV Ig infusions (n) | Specific treatment (VWF) |
|--------------------------------------|-----------------------|---|---|------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------|
| Case 1 Father, brother | Vaginal | Petechiae | 13 | Yes | - | 8 | 3 | 12 days after diagnosis |
| Case 2 Mother | Vaginal, Instrumental | Cephalhematoma, haemorrhagic conjunctivitis | 95 | No | - | - | - | - |
| Case 3 - | Vaginal | Petechiae | 7 | Yes | - | 9 | 2 | - |
| Case 4 - | Vaginal | Petechiae | 10 | Yes | - | - | 2 | - |
| Case 5 - | Vaginal | Icteria, Petechiae | 8 | Yes | Giant platelets | 9 | 1 | 485 days after diagnosis |
| Case 6 - | Vaginal | Petechiae | 6 | Yes | - | 7 | 2 | - |
| Case 7 Father | Vaginal | - | 9 | Yes | - | - | - | - |
| Case 8 Mother | Vaginal, Instrumental | Petechiae, ecchymose | 10 | No | - | 1 | 4 | - |
| Case 9 Father, uncle | Vaginal | - | 90 | No | - | 1 | 2 | - |
| Case 10 - | Vaginal | Petechiae, hemorrhagic shock | 21 | No | - | 12 | 5 | - |
| Case 11 Maternal thrombocytopenia | Vaginal | Petechiae | 5 | Yes | - | 2 | 2 | Yes |
| Case 12 Father, uncle | Vaginal | - | 20 | No | - | 2 | 2 | - |
| Case 13 Father, uncle, brother | Vaginal | - | 127 | No | - | 1 | 0 | 18 months later |
| Case 14 Mother | Vaginal, Instrumental | - | 11 | Yes | Giant platelets | 3 | 3 | - |
| Case 15 Mother, sister | Vaginal | - | 19 | Yes | - | - | - | - |
| Case 16 Father, brother, uncle | Vaginal | - | 19 | Yes | Giant platelets | - | - | - |
| Case 17 Father, brother, uncle | Vaginal | - | 5 | Yes | - | - | - | - |
| Case 18 Mother | Caesarian | - | 4 | Yes | Small platelets | - | - | - |

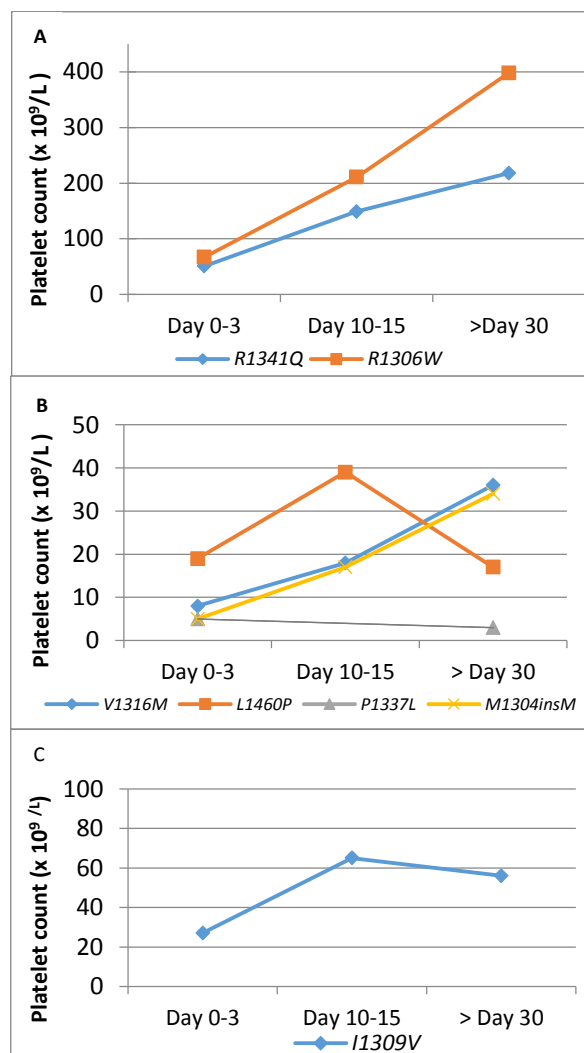
IV Ig: intravenous immunoglobulin

Table S2. VWF measurements, genomic analyze and age at first exploration of VWF for the 18 thrombocytopenic patients.

| | Age at first biological assessment | FVIII: C (U/dL) | VWF: Ag (U/dL) | VWF:RCo (U/dL) | VWF:RCo/Ag | RIPA | Multimeric Pattern | Mutation |
|---------|------------------------------------|-----------------|----------------|----------------|------------|----------|--------------------|-----------|
| Case 1 | Day 4 | 61 | 97 | 42 | 0.43 | Positive | ND | R1306W |
| | Day 45 | 54 | 50 | 15 | 0.30 | | | |
| Case 2 | Day 150 | ND | 90 | 54 | 0.60 | ND | ND | R1341Q |
| Case 3 | Day 13 | 90 | 105 | 8 | 0.08 | Negative | ND | L1460P |
| Case 4 | Day 90 | 45 | 33 | 10 | 0.30 | ND | No HMWM | V1316M |
| Case 5 | Day 365 | 52 | 27 | 10 | 0.37 | ND | ND | L1460P |
| Case 6 | Day 138 | 35 | 39 | 15 | 0.38 | Positive | No HMWM | V1316M |
| Case 7 | Day 120 | 30 | 54 | 26 | 0.48 | Positive | ND | ND |
| Case 8 | Day 1080 | 55 | 34 | 19 | 0.56 | Positive | No HMWM | R1341Q |
| Case 9 | Day 16 | 48 | 18 | 18 | 0.42 | Positive | No HMWM | R1341Q |
| Case 10 | Day 240 | 28 | 31 | 10 | 0.32 | Positive | No HMWM | V1316M |
| Case 11 | Day 390 | 28 | 48 | <7 | 0.14 | ND | No HMWM | P1337L |
| Case 12 | Day 3 | - | - | 146 | - | Positive | ND | I1309V |
| | Day 480 | 68 | 65 | 33 | 0.50 | | | |
| Case 13 | Day 1 | - | 149 | 137 | 0.92 | ND | ND | I1309V |
| | Day 540 | 60 | 69 | 23 | 0.33 | | | |
| Case 14 | Day 210 | 34 | 27 | 11 | 0.41 | Positive | ND | R1341Q |
| Case 15 | Day 0 | 17 | 41 | <13 | 0.32 | Positive | No HMWM | R1306W |
| Case 16 | Day 42 | 40 | 49 | 6 | 0.15 | Positive | No HMWM | M1304insM |
| Case 17 | Day 20 | 35 | 63 | 2 | 0.32 | Positive | No HMWM | M1304insM |
| Case 18 | Day 0 | 29 | 86 | 39 | 0.45 | Positive | No HMWM | M1304insM |

ND: not done; RIPA: ristocetin-induced platelet aggregation; HMWM: high molecular weight multimers

Figure S1: Evolution of median platelet count ($\times 10^9/L$) during the first month of life for patients with mutation *R1341Q* and *R1306W* (A); patients with mutation *V1316M*, *L1460P*, *P1337L* and *M1304insM* (B); patients with mutation *I1309V* (C).



11. ABBREVIATIONS

CGR : culot globulaire rouge

CPA : culot plaquettaire d'aphérèse

CRMW : Centre de Reference pour la Maladie de Willebrand

FVIII:C : activité du FVIII anti-hémophilique

Gp1b- α : glycoprotéine 1b- α

Ig : immunoglobulines polyvalentes

IgG : immunoglobuline de type G

IV : intraveineux

MHPM : multimères de haut poids moléculaire

MW : maladie de Willebrand

MW2B : maladie de Willebrand de type 2B

RIPA: ristocetin-induced platelet aggregation

VWF: facteur von Willebrand

VWF:Ag : dosage antigénique du VWF

VWF:RCo : activité cofacteur de la ristocétine du VWF

VWF:RCo/VWF:Ag : ratio de l'activité cofacteur de la ristocétine par rapport au dosage antigénique du VWF

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés.

Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences.

Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque.